

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 DK0001	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/04095	国際出願日 (日.月.年) 22.06.00	優先日 (日.月.年) 22.06.99
出願人(氏名又は名称) 国立感染症研究所長が代表する日本国		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 6 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☒ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☐ 出願人が提出したものを承認する。

☒ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

国際出願における発明の単一性の要件(PCT規則13.1)は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的關係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである(PCT規則13.2)。

そこで、本件国際出願の発明の単一性について検討する。

請求の範囲1-4の発明に共通する事項である「(a)~(d)よりなる群から選択され

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。





## 第Ⅲ欄 要約 (第1ページの5の続き)

本発明は、配列番号1～配列番号11のそれぞれに示すアミノ酸配列を有するペプチド等 (SRSV関連ウイルス構成ペプチド) に対する抗体の11種類全てを含有することを特徴とするSRSV検出キットに関する。

当該キットを用いれば、簡易で且つ確実に殆どのSRSV関連ウイルスを検出し、その血清型及び遺伝子型を判別することができる。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/569, C12N15/40

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/11-15/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG),  
WPI (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	NATORI, K. et al., "Chiba virus gene for capsid protein, complete cds, strain: Chiba 407.", GenBank Accession No. AB022679, September 1, 1999	7
A	SAITO, Hiroyuki et al., "Application of RT-PCR Designed from the Sequence of the Local SRSV Strain to the Screening in Viral Gastroenteritis Outbreaks", Microbiology and Immunology, June 20, 1998, Volume 42, Number 6, pages 439-446	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.09.00

国際調査報告の発送日

19.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
内田 俊生



4N 8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	NOEL, Jacqueline S. et al., "Correlation of Patient Immune Responses With Genetically Characterized Small Round-Structured Viruses Involved in Outbreaks of Nonbacterial Acute Gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995", Journal of Medical Virology, December, 1997, Volume 53, Number 4, pages 372-383	1-10
A	宇田川悦子ほか, "ウエスタンブロット法による小型球形ウイルス (SRSV) の血清疫学", 臨床とウイルス, 25-6-1989, 第17巻, 第2号, p. 154-158	1-10



## 第Ⅱ欄の続き

た一つのSRSV関連ウイルス構成ペプチドに対する抗体を全て含有するSRSV検出キット」は、PCT規則13.2における「特別な技術的特徴」である。一方、請求の範囲5の発明は「(e)～(k)よりなる群から選択された一つのSRSV関連ウイルス構成ペプチドに対する抗体を全て含有するSRSV検出キット」であるから、請求の範囲1～5の発明に共通する「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。なお、請求の範囲1～3の発明と請求の範囲5の発明との間には、「特別な技術的特徴」((e)～(k)よりなる群から選択された一つのSRSV関連ウイルス構成ペプチドに対する抗体を全て含有するSRSV検出キット)が存在する。

また、請求の範囲7～10の発明に共通する事項は「SRSV関連ウイルスの遺伝子」であるが、ある種の「SRSV関連ウイルスの遺伝子」は明らかに公知であったから、「SRSV関連ウイルスの遺伝子」は「特別な技術的特徴」とはなり得ず、請求の範囲7～10の発明には「特別な技術的特徴」は存在しない。ただし、例えば、請求の範囲1～4のSRSV検出キットは、いずれも請求の範囲7の遺伝子がコードしているペプチド(d)に対する抗体を含むものであるから、請求の範囲1～4の発明と請求の範囲7の発明との間には、ペプチド(d)という「特別な技術的特徴」が存在するといえる。

したがって、請求の範囲には、

- ① 請求の範囲1～4, 6 (請求の範囲1～4を引用する部分), 7の発明、
  - ② 請求の範囲5, 6 (請求の範囲5を引用する部分), 8の発明、
  - ③ 請求の範囲9の発明、及び、
  - ④ 請求の範囲10の発明
- の4発明が含まれている。

(請求の範囲の番号の小さい方から順に、発明をまとめた。)





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application N .

PCT/JP00/04095

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/569, C12N15/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11-15/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG),  
WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	NATORI, K. et al., "Chiba virus gene for capsid protein, complete cds, strain: Chiba 407.", GenBank Accession No. AB022679, 01 September, 1999	7
A	SAITO, Hiroyuki et al., "Application of RT-PCR Designed from the Sequence of the Local SRSV Strain to the Screening in Viral Gastroenteritis Outbreaks", Microbiology and Immunology, 20 June, 1998, Volume 42, Number 6, pages 439-446	1-10
A	NOEL, Jacqueline S. et al., "Correlation of Patient Immune Responses With Genetically Characterized Small Round-Structured Viruses Involved in Outbreaks of Nonbacterial Acute Gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995", Journal of Medical Virology, December, 1997, Volume 53, Number 4, pages 372-383	1-10
A	Etsuko UDAGAWA et al., "Western Blood Hou ni yoru Kogata Kyukei Virus (SRSV) no Kessei Ekigaku", Rinshou to Virus, 25-6-1989, Vol.17, No.2, pp.154-158	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
12 September, 2000 (12.09.00)

Date of mailing of the international search report  
19 September, 2000 (19.09.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

11

12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04095

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

In international applications, requirement of unity of invention (PCT Rule 13.1) cannot be satisfied unless there is a technical relationship in a group of inventions as set forth in claims involving one or more of the same or corresponding technical features. The term "technical features" means technical features clearly indicating the contribution to the prior art achieved by the overall inventions as set forth in claims (PCT Rule 13.2).

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application N .

PCT/JP00/04095

## Continuation of Box No. II of continuation of first sheet (1)

Now, the unity of inventions in the present international application will be discussed.

Inventions as set forth in claims 1 to 4 pertain to "an SRSV detection kit containing all of the antibodies against one peptide constituting SRSV-associated viruses selected from the group consisting of (a) to (d)" in common which corresponds to a "special technical feature" as specified in PCT Rule 13.2. On the other hand, invention as set forth in claim 5 pertains to "an SRSV detection kit containing all of the antibodies against one peptide constituting SRSV-associated viruses selected from the group consisting of (e) to (k)". Therefore, it is concluded that the inventions as set forth in claims 1 to 5 have no "special technical feature" in common. There is a "special technical feature", i.e., "an SRSV detection kit containing all of the antibodies against one peptide constituting SRSV-associated viruses selected from the group consisting of (e) to (k)" between a group of the inventions as set forth in claims 1 to 3 and the invention as set forth in claim 5.

Although inventions as set forth in claims 7 to 10 have a matter "a gene of an SRSE-associated virus" in common, a certain "gene of an SRSV-associated virus" had been publicly known. Therefore, the "gene of an SRSE-associated virus" could not be regarded as a "special technical feature" and thus the inventions as set forth in claims 7 to 10 have no "special technical feature". However, there is a "special technical feature" concerning the peptide (d) in the group of the inventions as set forth in claims 1 to 4 and the invention as set forth in claim 7, since, for example, the SRSV detection kits of claims 1 to 4 each contains antibodies against the peptide (d) which is encoded by the gene as set forth in claim 7.

Such being the case, the claims of the present application involve the following four groups of inventions:

- ① a group of the inventions as set forth in claims 1 to 4, 6 (the parts depending on claims 1 to 4) and 7;
  - ② a group of the inventions as set forth in claims 5, 6 (the part depending on claim 5) and 8;
  - ③ the invention as set forth in claim 9; and
  - ④ the invention as set forth in claim 10;
- (inventions are gathered together in decreasing order of claim number).



## PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ARUGA, Mitsuyuki  
Kyodo Bldg.  
3-6, Nihonbashiningyocho 1-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 103-0013  
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 13 October 2000 (13.10.00)	
Applicant's or agent's file reference DK0001	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/04095	International filing date (day/month/year) 22 June 2000 (22.06.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 22 June 1999 (22.06.99)
Applicant JAPAN as represented by DIRECTOR-GENERAL NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
22 June 1999 (22.06.99)	11/175928	JP	11 Augu 2000 (11.08.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Tessadel PAMPLIEGA <i>top</i>  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--





## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ARUGA, Mitsuyuki  
Kyodo Bldg.  
3-6, Nihonbashiningyocho 1-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 103-0013  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 28 December 2000 (28.12.00)		
Applicant's or agent's file reference DK0001		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP00/04095	International filing date (day/month/year) 22 June 2000 (22.06.00)	Priority date (day/month/year) 22 June 1999 (22.06.99)
Applicant JAPAN as represented by DIRECTOR-GENERAL NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AG,AU,DZ,KP,KR,MZ,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,  
GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,  
NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on  
28 December 2000 (28.12.00) under No. WO 00/79280

**REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)**

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

**REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))**

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  J. Zahra  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---



# PATENT COOPERATION TREATY

EO/US  
PCT/JP00/04095

**PCT**

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
in its capacity as elected Office

Date of mailing:

28 December 2000 (28.12.00)

International application No.:

PCT/JP00/04095

Applicant's or agent's file reference:

DK0001

International filing date:

22 June 2000 (22.06.00)

Priority date:

22 June 1999 (22.06.99)

Applicant:

TAKEDA, Naokazu et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

30 October 2000 (30.10.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 18 MAY 2001

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 DK0001	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JPO0/04095	国際出願日 (日.月.年) 22.06.00	優先日 (日.月.年) 22.06.99	
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>7</sup> G01N33/569, C12N15/40			
出願人 (氏名又は名称) 国立感染症研究所長が代表する日本国			

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input checked="" type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 30.10.00	国際予備審査報告を作成した日 02.05.01		
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  内 田 俊 生 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B	8214

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

D



## 1. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。
4. 補正により、下記の書類が削除された。
- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図
5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)









## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-10	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1-10	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-10	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1: SAITO, Hiroyuki et al., "Application of RT-PCR Designed from the Sequence of the Local SRSV Strain to the Screening in Viral Gastroenteritis Outbreaks", Microbiology and Immunology, June 20, 1998, Volume 42, Number 6, pages 439-446

文献2: NOEL, Jacqueline S. et al., "Correlation of Patient Immune Responses With Genetically Characterized Small Round-Structured Viruses Involved in Outbreaks of Nonbacterial Acute Gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995", Journal of Medical Virology, December, 1997, Volume 53, Number 4, pages 372-383

文献3: 宇田川悦子ほか, "ウエスタンブロット法による小型球形ウイルス (SRSV) の血清疫学", 臨床とウイルス, 25-6-1989, 第17巻, 第2号, p. 154-158

請求の範囲 1-10

請求の範囲 1-10 の発明は、国際調査報告で引用された文献 1-3 に対して、新規性及び進歩性を有する。

文献 1-3 は、抗原-抗体反応による SRSV の検出について記載した文献ではあるものの、それらには、本国際出願における配列番号 15, 20, 21 又は 22 で示される塩基配列を有する遺伝子、及び、該遺伝子がコードするペプチドが記載されておらず、かつ、それらは当該技術分野の専門家にとって自明なことでもない。





## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

13T  
Translation

Applicant's or agent's file reference DK0001	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/04095	International filing date (day/month/year) 22 June 2000 (22.06.00)	Priority date (day/month/year) 22 June 1999 (22.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/569, C12N 15/40		
Applicant JAPAN as represented by DIRECTOR-GENERAL NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 30 October 2000 (30.10.00)	Date of completion of this report 02 May 2001 (02.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04095

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

1 international application No.  
PCT/JP00/04095

## IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☒ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See supplemental sheet for continuation of Box IV. 3.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. \_\_\_\_\_



**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV. 3.

Where a group of inventions is claimed in one and the same international application, the requirement of unity of invention (PCT Rule 13.1) shall be fulfilled only when there is a technical relationship among those inventions described in the claims involving one or more of the same or corresponding special technical features. The expression "special technical features" shall mean those technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art.

Accordingly, the unity of the inventions of the present international application is discussed below.

The common feature of the inventions described in Claims 1 to 4, which is "an SRSV detection kit containing all of the antibodies for one peptide forming part of an SRSV-associated virus selected from the group consisting of (a) to (d)" corresponds to a "special technical feature" as specified in PCT Rule 13.2. Meanwhile, the invention described in Claim 5 is "an SRSV detection kit containing all of the antibodies for one peptide forming part of an SRSV-associated virus selected from the group consisting of (e) to (k)." Therefore, it can be concluded that the inventions described in Claims 1 to 5 have no "special technical feature" in common. There is a "special technical feature" of "an SRSV detection kit containing all of the antibodies for one peptide forming part of an SRSV-associated virus selected from the group consisting of (e) to (k)" between the inventions described in Claims 1 to 3 and the invention described in Claim 5.

Although the inventions described in Claims 7 to 10



**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV. 3.

have "an SRSV-associated virus gene" as a common feature, certain "SRSV-associated virus genes" were clearly already known in the art. Therefore, "an SRSV-associated virus gene" cannot be considered a "special technical feature," and therefore, the inventions described in Claims 7 to 10 have no "special technical feature." However, the inventions described in Claims 1 to 4 and the invention described in Claim 7 do share a "special technical feature" in the peptide (d) because, for example, the SRSV detection kits of Claims 1 to 4 all include antibodies for the peptide (d) encoded by the gene described in Claim 7.

As such, the claims include the following four groups of inventions:

- 1) The inventions described in Claims 1-4, 6 (the portions dependent on Claims 1 to 4), and 7
  - 2) The inventions described in Claims 5, 6 (the portions dependent on Claim 5), and 8
  - 3) The invention described in Claim 9
  - 4) The invention described in Claim 10
- (Inventions are grouped in numerical order.)



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/04095

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

Document 1: Hiroyuki Saito, et al., "Application of RT-PCR Designed from the Sequence of the Local SRSV Strain to the Screening in Viral Gastroenteritis Outbreaks," Microbiology and Immunology, 20 June 1998, Vol. 42, No. 6, pp. 439-446

Document 2: Jacqueline S. Noel, et al., "Correlation of Patient Immune Responses with Genetically Characterized Small Round-Structured Viruses Involved in Outbreaks of Nonbacterial Acute Gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995," Journal of Medical Virology, December 1997, Vol. 53, No. 4, pp. 372-383

Document 3: Etsuko Udagawa, et al., "Seroepidemiology of Small Round-Structured Viruses (SRSV) Using the Western Blotting Method," Rinshou to Uirusu (Clinical Virology), 25 June 1989, Vol. 17, No. 2, pp. 154-158

## Claims 1 to 10

The inventions described in Claims 1 to 10 are novel and involve an inventive step relative to Documents 1 to 3 cited in the international search report.

Although Documents 1 to 3 do disclose the detection





INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/JP 00/04095

of SRSV using antigen and antibody reactions, the documents do not disclose the genes described in this international application as having base sequences represented by SEQ ID NO: 15, 20, 21, and 22 or the peptides encoded by said genes, and these would not be obvious to a person skilled in the art.



(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2000 年12 月28 日 (28.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 00/79280 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: G01N 33/569, C12N 15/40
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/04095
- (22) 国際出願日: 2000 年6 月22 日 (22.06.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願平11/175928 1999 年6 月22 日 (22.06.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立感染症研究所長が代表する日本国 (JAPAN as represented by DIRECTOR-GENERAL NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES) [JP/JP]; 〒162-0052 東京都新宿区戸山一丁目23番1号 Tokyo (JP). デンカ生研株式会社 (DENKA SEIKEN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-0025 東京都中央区日本橋茅場町三丁目4番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 武田直和 (TAKEDA, Naokazu) [JP/JP]. 名取克郎 (NATORI, Katsuro) [JP/JP]. 宮村達男 (MIYAMURA, Tatsuo) [JP/JP]; 〒162-0052 東京都新宿区戸山一丁目23番1号 国立感染症研究所内 Tokyo (JP). 鎌田公仁夫 (KAMATA, Kunio) [JP/JP]. 佐藤俊則 (SATO, Toshinori) [JP/JP]. 佐藤征也 (SATO, Seiya) [JP/JP]; 〒959-1836 新潟県五泉市南本町一丁目2番2号 デンカ生研株式会社内 Niigata (JP).
- (74) 代理人: 有賀三幸, 外 (ARUGA, Mitsuyuki et al.); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SRSV DETECTION KIT

(54) 発明の名称: SRSV検出キット

(57) Abstract: An SRSV detection kit characterized by containing all of 11 antibodies against peptides having the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:1 to 11 and the like (peptides constituting SRSV-associated viruses). By using this kit, most of SRSV-associated viruses can be conveniently and surely detected and the serotypes and genotypes thereof can be distinguished.

(57) 要約:

本発明は、配列番号1～配列番号11のそれぞれに示すアミノ酸配列を有するペプチド等 (SRSV関連ウイルス構成ペプチド) に対する抗体の11種類全てを含有することを特徴とするSRSV検出キットに関する。

当該キットを用いれば、簡易で且つ確実に殆どのSRSV関連ウイルスを検出し、その血清型及び遺伝子型を判別することができる。

6629280

WO 00/79280 A1



## 明 細 書

## S R S V検出キット

## 技術分野

本発明は、検体中の小型球形ウイルス (Small Round Structured Virus、以下「S R S V」という) を検出、判別するためのキットに関する。

## 背景技術

S R S Vは、1972年に発見されたヒトのウイルス性胃腸炎の原因ウイルスの一つであり、小児期の急性胃腸炎や成人や年長児に食中毒様の集団発生を引き起こすことが知られている。S R S Vは、細胞培養によってウイルスを増殖させることができず且つ感受性を示す動物モデルもないことから、S R S V抗原及び抗S R S V抗体の入手は困難であり、当該ウイルスの免疫血清学的な検出法の開発は遅れていた。

斯かる状況の下、1993年にS R S Vの一つであるノーウォーク (Norwalk) ウイルスの遺伝子クローニングが成功し全ゲノムの塩基配列が解析され (特表平6-506823号公報)、その後RNAポリメラーゼ領域の一部を増幅するPCR法が開発され、これまでに14種類のS R S V関連ウイルスが見出されている。更にこれらのRNAポリメラーゼ領域の約120アミノ酸についての分析により、S R S Vはノーウォークウイルス株をプロトタイプとする遺伝子型Iとスノーマウンテン (Snow Mountain) ウイルス株をプロトタイプとする遺伝子型IIの大きく2つの遺伝子型 (genogroup) に分類できるとされている。

しかし、S R S V関連ウイルスの遺伝子解析が進むにつれ、同一遺伝子型内でも多くの多様性があることが知られ、実際に各遺伝子型のプロトタイプであるノーウォークウイルス株及びスノーマウンテンウイルス株の遺伝子に対するプライ

マーを用いたR T - P C R法では、全てのS R S Vを検出できず、S R S Vを効率良く増幅させるプライマーの構築やR T - P C R法の条件の設定は非常に困難であることが明らかとなった。

一方、遺伝子発現により、ノーウォークウイルス株、スノーマウンテンウイルス株等の一部のウイルスについては抗原が作製され、抗体の取得及びこれを用いたE L I S AによるS R S V検出法も構築されているが、S R S Vの多様性により胃腸炎を引き起こす全てのS R S Vを確実に検出することができなかった。

他方、わが国では、平成9年にS R S Vが食品衛生法における食中毒原因因子に指定され、S R S Vによる食中毒が発生した場合にはその感染ルートの特定が必須となり、感染者の便及び食品中のS R S Vを簡便で且つ確実に検出同定する方法が望まれていた。

#### 発明の開示

従って、本発明の目的は、検体からこれまでに見出されているS R S V関連ウイルスを簡易に検出でき、その血清型及び遺伝子型を確実に判別できるキットを提供することにある。

本発明者らは、斯かる実状に鑑みS R S V関連ウイルスについて遺伝学的及び免疫学的に検討したところ、新たに見出された新規ウイルスペプチドを加えた11種のS R S V関連ウイルスペプチドより得られる抗体を組み合わせる用いることにより、検体中の殆どのS R S Vを検出でき、S R S Vの血清型及び遺伝子型を確実に判別できることを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、下記(a)～(k)；

(a) 配列番号1に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(b) 配列番号2に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列

に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(c) 配列番号 3 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(d) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(e) 配列番号 5 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(f) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(g) 配列番号 7 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(h) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(i) 配列番号 9 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(j) 配列番号 10 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(k) 配列番号 11 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

よりなる群から選択された一つの S R S V 関連ウイルス構成ペプチドに対する抗体を全て含有することを特徴とする S R S V 検出キットを提供するものである。

また本発明は、下記 S R S V 関連ウイルス (a) ~ (d) ;

(a) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列

に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(c) 配列番号 3 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(d) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

よりなる群から選択された一つの SRSV 関連ウイルス構成ペプチドに対する抗体を全て含有することを特徴とする SRSV 遺伝子型判別のための SRSV 検出キットを提供するものである。

更に本発明は、下記 SRSV 関連ウイルス (e) ~ (k) ;

(e) 配列番号 5 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(f) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(g) 配列番号 7 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(h) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(i) 配列番号 9 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(j) 配列番号 10 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(k) 配列番号 11 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

よりなる群から選択された一つの SRSV 関連ウイルス構成ペプチドに対する抗体を全て含有することを特徴とする SRSV 遺伝子型判別のための SRSV 検出



キットを提供するものである。

更にまた、本発明は、配列番号 15、20、21 及び 22 で示される塩基配列又は該塩基配列の 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を有する SRSV 関連ウイルス株遺伝子を提供するものである。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、Hu/NLV/Seto 124/1989/J P 株由来の中空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である (×100, 000)。

図 2 は、Hu/NLV/Funabashi 258/1996/J P 株由来の中空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である (×100, 000)。

図 3 は、Hu/NLV/Chiba 407/1987/J P 株由来の中空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である (×100, 000)。

図 4 は、Hu/NLV/Narita 104/1997/J P 株由来の中空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である (×100, 000)。

図 5 は、Hu/NLV/Sanbu 809/1998/J P 株由来の中空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である (×100, 000)。

図 6 は、Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/J P 株由来の中空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である (×100, 000)。

図 7 は、Hu/NLV/Chitta 1876/1996/J P 株由来の中空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である (×100, 000)。

図 8 は、Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/J P 株由来の中空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である (×100, 000)。

図 9 は、Hu/NLV/Mie 7k/1994/J P 株由来の中空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である (×100, 000)。

図 10 は、Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/J P 株由来の中

空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である（×100,000）。

図11は、Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP株由来の中  
空ウイルス粒子の電子顕微鏡写真である（×100,000）。

発明を実施するための最良の形態

#### 1. SRSV関連ウイルス

本発明のSRSV検出キットは、前記（a）～（k）群の11種類の特定のアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するSRSV関連ウイルス構成ペプチドに対する抗体を用いることを特徴とするものである。このうち、（d）群、（i）群、（j）群及び（k）群に属するペプチドは、現在までにジーンバンクに登録されている全てのSRSV関連ウイルス株（下記表1）とは異なる新規ペプチドであり、これらに対する抗体を含めて11種類の抗体を含有したキットすることにより、SRSV関連ウイルスを漏れなく検出することができる。

本発明SRSV関連ウイルス構成ペプチドには、ペプチドとしてそれらと同等の抗原性を有する限り、そのアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加された変異体、又は当該アミノ酸配列をコードする塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された変異体が包含される。

（a）群における配列番号1に示すアミノ酸配列を有するペプチドとしては、例えば日本のSRSV感染患者の糞便由来Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/JP株のウイルス構成ペプチドが挙げられ、該アミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するペプチドとしては、例えばDesert Shield/90/SA株（ジーンバンク登録番号：U04469）由来のもの等が包含される。

(b) 群における配列番号2に示すアミノ酸配列を有するペプチドとしては、例えば日本のSRSV感染患者の糞便由来Hu/NLV/Seto 124/1989/J P株のウイルス構成ペプチドが挙げられ、該アミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するペプチドとしては、例えばKY-89/89 J株（ジーンバンク登録番号：L23828）及びNorwalk/68/US株（ジーンバンク登録番号：M876611）由来のもの等が包含される。

(c) 群における配列番号3に示すアミノ酸配列を有するペプチドとしては、例えば日本のSRSV感染患者の糞便由来Hu/NLV/Funabashi 258/1996/J P株のウイルス構成ペプチドが挙げられ、該アミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するペプチドとしては、例えばSouthampton/91/UK株（ジーンバンク登録番号：L07418）由来のもの等が包含される。

(d) 群における配列番号4に示すアミノ酸配列を有するペプチドとしては、例えば日本のSRSV感染患者の糞便由来Hu/NLV/Chiba 407/1987/J P株のウイルス構成ペプチドが挙げられる。

斯かる配列番号4に示すアミノ酸配列を有するペプチドは、現在までにジーンバンクに登録されている全てのSRSV関連ウイルス株（下記表1）と構造遺伝子（配列番号15）の相同性が75%未満であり、これまでに報告のない新規な配列を有するペプチドである。

(e) 群における配列番号5に示すアミノ酸配列を有するペプチドとしては、例えば日本のSRSV感染患者の糞便由来Hu/NLV/Narita 104/1997/J P株のウイルス構成ペプチドが挙げられ、該アミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するペプチドとしては、例えばBristol/93/UK株（ジーンバンク登録番号：X76716）、Lordsdale/93/UK（ジーンバンク登録番号：X86557）、Camberwell/94

／AU株（ジーンバンク登録番号：U46500）由来のもの等が包含される。

（f）群における配列番号6に示すアミノ酸配列を有するペプチドとしては、例えば日本のSRSV感染患者の糞便由来Hu／NLV／Sanbu 809／1998／JP株のウイルス構成ペプチドが挙げられ、該アミノ酸配列に対して80％以上の相同性を有するペプチドとしては、例えばMexico／89／MEX株（ジーンバンク登録番号：U22498）、Auckland株（ジーンバンク登録番号：U460391）、Toronto／77／CA株（ジーンバンク登録番号：U02030）、OTH-25／89／J（ジーンバンク登録番号：L23830）由来のもの等が包含される。

（g）群における配列番号7に示すアミノ酸配列を有するペプチドとしては、例えば日本のSRSV感染患者の糞便由来Hu／NLV／Ichikawa 754／1998／JP株のウイルス構成ペプチドが挙げられ、該アミノ酸配列に対して80％以上の相同性を有するペプチドとしては、例えばSnow Mountain／76／US株（ジーンバンク登録番号：U70059）、Melksham／89／UK株（ジーンバンク登録番号：X81879）由来のもの等が挙げられる。

（h）群における配列番号8に示すアミノ酸配列を有するペプチドとしては、例えば日本のSRSV感染患者の糞便由来Hu／NLV／Chitta 1876／1996／JP株のウイルス構成ペプチドが挙げられ、該アミノ酸配列に対して80％以上の相同性を有するペプチドとしては、例えばHawaii／71／US株（ジーンバンク登録番号：U07611）由来のもの等が包含される。

（i）群における配列番号9に示すアミノ酸配列を有するペプチドとしては、例えば日本のSRSV感染患者の糞便由来Hu／NLV／Kashiwa 47／1997／JP株のウイルス構成ペプチドが挙げられる。

斯かる配列番号9に示すアミノ酸配列を有するペプチドは、現在までにジーン

バンクに登録されている全てのSRSV関連ウイルス株（下記表1）と構造遺伝子（配列番号20）の相同性が75%未満であり、これまでに報告のない新規な配列を有するペプチドである。

（j）群における配列番号10に示すアミノ酸配列を有するペプチドとしては、例えば日本のSRSV感染患者の糞便由来Hu/NLV/Mie 7k/1994/J P株のウイルス構成ペプチドが挙げられる。

斯かる配列番号10に示すアミノ酸配列を有するペプチドは、現在までにジーンバンクに登録されている全てのSRSV関連ウイルス株（下記表1）と構造遺伝子（配列番号21）の相同性が70%未満であり、これまでに報告のない新規な配列を有するペプチドである。

（k）群における配列番号11に示すアミノ酸配列を有するペプチドとしては、例えば日本のSRSV感染患者の糞便由来Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/J P株のウイルス構成ペプチドが挙げられる。

斯かる配列番号11に示すアミノ酸配列を有するペプチドは、現在までにジーンバンクに登録されている全てのSRSV関連ウイルス株（下記表1）と構造遺伝子（配列番号22）の相同性が70%未満であり、これまでに報告のない新規な配列を有するペプチドである。

表 1

ウイルス株	ジーンバンク 登録番号
Desert Shield/90/SA	U04469
Norwalk/68/us	M876611
KY-89/89J	L23828
OTH-25/89/J	L23830
Southampton/91/UK	L07418
Lordsdale/93/UK	X86557
Bristol/93/UK	X76716
Camberwell/94/AU	U46500
Toronto/77/CA	U02030
Mexico/89/MEX	U22498
Snow Mountain/76/US	U70059
Melksham/89/UK	X81879
Auckland	U460391
Hawaii/71/US	U07611

これら（a）～（k）群のSRSV関連ウイルス構成ペプチドには、上記ペプチドの他に、当該ペプチド中の特定のアミノ酸配列を有し、当該ペプチドと同等の抗原性を有する部分ペプチドが包含される。

これらのSRSV関連ウイルス構成ペプチドは、そのRNAポリメラーゼ領域の約120アミノ酸についてのホモロジー解析によれば2つの遺伝子型に分類することができる。即ち、（a）～（d）群のペプチドの属するI型と、（e）～（k）群のペプチドが属するII型に分類される。

## 2. SRSV関連ウイルス構造遺伝子のクローニング

SRSV感染患者の便よりセチルトリメチルアンモニウムブロマイド法等を用いて、ウイルスRNAを抽出し、オリゴ-dTプライマー及び逆転写酵素によりcDNAを作製し、これと各SRSV関連ウイルスの構造遺伝子領域を増幅するプライマーを用いてPCRを行うことにより構造遺伝子断片を増幅する。

斯かる構造遺伝子断片は、一度大腸菌クローニングベクターを用いてTAクロ

ーニングを行いプラスミドに組み込まれる。

ここで使用可能なクローニングベクターとしては、大腸菌に代表される原核細胞を宿主とするプラスミド及び入ファージ等に代表されるバクテリオファージ由来のベクター等公知のものを使用でき、クローニングベクターとその宿主細胞とを適当に組み合わせて使用することが望ましい。クローニングベクターの具体的な例としては、pBR322、pUC19、pCRII等が挙げられる。また、遺伝子の挿入方法は公知の常法に従えばよく、これらのベクターの構築にあたっては、遺伝子操作の容易である大腸菌系を使用することが望ましい。

### 3. 構造遺伝子の発現及び中空ウイルス粒子の作製

上記で得られた(a)～(k)群の各ウイルス構造遺伝子の断片を適当な発現系を用いて発現させるか或いは、該ウイルス構成ペプチドから遺伝子工学的に作製された中空ウイルス粒子を用いることにより、各ウイルスに対する抗体を得ることができる。以下に大腸菌を用いた場合の発現と、中空ウイルス粒子の作製について説明する。

#### (1) 大腸菌による発現

各SRSV関連ウイルスの構造遺伝子領域を組み込んだプラスミドを、構造遺伝子領域を切断しない制限酵素で消化後構造遺伝子領域を回収し、例えば、pGEX(GST融合蛋白発現ベクター;ファルマシア製)、pTrc99A(大腸菌発現ベクター;ファルマシア製)、pTrxFus(チオレドキシン融合蛋白発現ベクター;インビトロゲン社製)、pET(pT7RNAプロモーターを用いた発現ベクター;ノバゲン社製)、マルトース結合蛋白又は $\beta$ ガラクトシダーゼの融合蛋白発現ベクター等に組み込む。このとき、組み込む構造遺伝子領域は、完全長でもよいし、部分的な領域でもよく、好ましくはSRSVの抗原エピトープを最低一つ有する部分的な領域である方がよい。このようにして構造遺伝子領域を組み込んだ遺伝子発現ベクターを遺伝子発現に適した大腸菌、例えば、B

L 2 1 株、D H 1 0 B 株、J M 1 0 9 株、X L 1 - B l u e 株等で形質転換する。得られた形質転換体を一般的な培養液、例えばL - b r o t h 等で培養することにより遺伝子発現を行うことができる。発現には、遺伝子発現誘導剤、例えばI P T G等を添加することや、P L プロモーターを用いた場合、熱ショックを与えることが好ましい。

発現されたペプチドの精製は、一般的な大腸菌を用いた発現蛋白の精製法に従えばよく、例えば、発現蛋白が可溶化していたならばG S T カラム又はマルトース結合蛋白用カラムを用いたアフィニティー精製を行えばよく、発現蛋白が不溶化していたならば、N i キレートを用いたアフィニティー精製を行えばよい。

#### (2) S R S V 中空ウイルス粒子の作成

S R S V 関連ウイルスの構造遺伝子領域を組み込んだプラスミドを、構造遺伝子領域を切断しない制限酵素で消化し構造遺伝子領域を回収し、例えばp V L 1 3 9 3 等のバキュロウイルストランスファーベクターに組み込む。斯かるトランスファーベクターと直鎖状で増殖必須遺伝子領域を欠失させてあるバキュロウイルスDNAと共にトランスフェクションし、昆虫細胞内で相同組換えを起こさせることにより目的とする組換えバキュロウイルスを作製することができる。

得られた組換えバキュロウイルスをS f 9 細胞、T n 5 細胞等の昆虫細胞に感染させ、常法により適当な成育条件下で培養することによりS R S V の構造蛋白を発現させ、自己集合させることにより中空ウイルス粒子を生産させることができる。生化学的な精製法例えば遠心分離等を用いれば中空ウイルス粒子を分離精製することができる。中空ウイルス粒子が形成されているかどうかは、ウラニル酢酸でネガティブ染色し、電子顕微鏡で検鏡することにより確認することができる。

かくして得られた中空ウイルス粒子は、内部に遺伝子を持たないため感染性はないが、構造がウイルス粒子とほぼ同じ形をしているので、ウイルス粒子と同等



な抗原性を持つものである。

#### 4. S R S V 関連ウイルスに対する抗体の取得

得られたウイルス構成ポリペプチド又は中空ウイルス粒子を動物に免疫することにより、抗 S R S V 関連ウイルス抗体を調製することができる。尚、斯かる抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の何れでもよい

例えば、中空ウイルス粒子を用いた場合の免疫抗体の作製は、精製された各 S R S V 関連ウイルスの中空ウイルス粒子を常法に従ってウサギに免疫し、分離血清より中空ウイルス粒子に対する I g G 抗体（抗 S R S V 抗体）を取得することができる。尚、抗体の分離精製には D E A E セファロースクロマトグラフィー等の手段が用いられる。

かくして得られた（a）～（k）群からなる 11 種類の中空ウイルス粒子と対応する抗 S R S V 抗体を用いてその交差反応性を測定すると、後記表 2 に示すように各 S R S V 関連ウイルス間では交差反応は全く示さない。従って、本発明の S R S V の検出法によれば、S R S V の 11 種類の血清型を同時に判別することが可能である。また、このことは同時に遺伝子型 I と遺伝子型 II の判別が可能であることも示している。

#### 5. S R S V 関連ウイルスの検出

上記で得られた各抗 S R S V 抗体を用いた検体中の S R S V の検出は、通常用いられる抗原抗体反応を利用した免疫学的測定法、例えばサンドイッチ法によるラジオイムノアッセイや酵素免疫測定法（E L I S A）等を用いることができるが、特に E L I S A が好ましい。即ち、11 種類の抗 S R S V 抗体をマイクロプレートに分注して S R S V スクリーニングプレートを作製し、S R S V 感染患者の便から調製した便乳剤の希釈液を当該プレートのウェルに加えて反応させた後、各ウイルスのパーオキシダーゼ（P O D）標識抗 S R S V 抗体を加えて反応させる。次いで基質液（過酸化水素を含む T M B）を加えて反応させた後、0.6

N硫酸を加えて反応を停止させ、ELISAオートリーダーでウェルの吸光度（450nm/630nm）を測定することによりSRSVを検出できる。

ここで、検体中のSRSVの検出のみを行う場合には、11種類の抗SRSV抗体全てを混合固定化したマイクロプレートを用いたキットとすればよく、SRSVの血清型まで判別する場合には、11種類の抗SRSV抗体全てをそれぞれ別個のプレートに固定化したマイクロプレートを用いたキットとすればよい。

また、遺伝子型の判別は、(a)～(d)群のペプチドに対する抗体を混合固定化したマイクロプレート（I型プレート）又は(e)～(k)群のペプチドに対する抗体を混合固定化したマイクロプレート（II型プレート）を用いたキットとすることにより可能となる。

尚、本発明の各抗SRSV抗体をラテックスや磁気ビーズ等の担体を用いて固定化することにより、検体中のSRSV関連ウイルスを確実に捕捉することができ、ラテックスならば遠心操作、磁気ビーズならば磁石でSRSV捕捉担体を回収することができ、回収後にウイルスRNAを抽出し利用することができる。

## 実施例

以下、実施例により本発明のSRSV検出キットを具体的に説明する。

### 実施例1 SRSV関連ウイルスの構造遺伝子のクローニング

#### (1) cDNA合成

SRSV患者の便（0.5～1.0g）に9mLのPBSと1mLのダイフロンを加え、ホモジナイズした。次いで、3000rpmで20分間遠心してその上清を回収し、10%便乳剤とした。

この便乳剤1mLを用い、セチルトリメチルアンモニウムブロマイド法によりSRSVのRNAを抽出し、最終的に0.1%ジエチルピロカーボネート液30 $\mu$ Lに浮遊させた。この浮遊液を用いて、Oligo-dT（12-18）ブラ

イマー及びAMV (Avian Myeloblastosis Virus) (生化学工業社製) 由来逆転写酵素によりcDNAを作製した。

(2) 構造遺伝子領域の単離

(1) で作製したcDNAと、以下に示す構造遺伝子領域を増幅するプライマーを用いてPCRを行い、PCR後、アガロースゲル電気泳動法により増幅させた構造遺伝子断片を分離し、SuprecTM-01 (TAKARA) を用いて回収した。

Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/J P遺伝子:G1/F2 (配列番号23)、Oligo-dT (33) (配列番号24)

Hu/NLV/Seto 124/1989/J P遺伝子:G1/F2 (配列番号23)、G1/R0 (配列番号25)

Hu/NLV/Funabashi 258/1996/J P遺伝子:G1/F2 (配列番号23)、Oligo-dT (33) (配列番号24)

Hu/NLV/Chiba 407/1987/J P遺伝子:D5 (配列番号26)、CV-U4 (配列番号27)

Hu/NLV/Narita 104/1997/J P遺伝子:97k104/F1 (配列番号28)、97k104/R1 (配列番号29)

Hu/NLV/Sanbu 809/1998/J P遺伝子:G2/F3 (配列番号30)、MV-R1 (配列番号31)

Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/J P遺伝子:G2/F3 (配列番号30)、SMV-R1 (配列番号32)

Hu/NLV/Chitta 1876/1996/J P遺伝子:G2/F3 (配列番号30)、G2/R0 (配列番号33)

Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/J P遺伝子:97k104/F1 (配列番号28)、Oligo-dT (33) (配列番号24)

Hu/NLV/Mie 7k/1994/J P遺伝子:G2/F3 (配列番号30)、Oligo-dT (33) (配列番号24)

Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/J P遺伝子:GFCR7 (配列番号34)、Oligo-dT (33) (配列番号24)

### (3) 構造遺伝子のクローニング

回収した構造遺伝子断片を、大腸菌クローニングベクターpCRII (INVITROGEN社製) にTAクローニングを行った。これらのクローンからウイルスの構造遺伝子を組み込むプラスミドpCRII/645、pCRII/124、pCRII/258、pCRII/Chiba、pCRII/104、pCRII/809、pCRII/754、pCRII/76、pCRII/47、pCRII/7k、pCRII/10-25を得た。

### 実施例2 塩基配列の決定

Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/J P株、Hu/NLV/Seto 124/1989/J P株、Hu/NLV/Funabashi 258/1996/J P株、Hu/NLV/Chiba 407/1987/J P株、Hu/NLV/Narita 104/1997/J P株、Hu/NLV/Sanbu 809/1998/J P株、Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/J P株、Hu/NLV/Chitta 1876/1996/J P株、Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/J P株、Hu/NLV/Mie 7k/1994/J P株及びHu/NLV/Osaka 10-25/1999/J P株の構造遺伝子の塩基配列の決定は、以下の方法により行った。

はじめに、トランスファーベクターであるpVL1393のポリヘドリンプロモーターの近傍にプライマー (第1プライマー) を設定し、dye termination法によりサイクルシーケンシングキットFS (パーキンエルマー社製) を用いてラベリング反応を行った。この際使用したトランスファーベクタ

一のDNA濃度は $0.4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ であり、シーケンシングプライマーの濃度は $3.2 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ である。更に、反応終了後、セントリプレックスピンカラム（パーキンエルマー社）を用いて過剰量の蛍光色素を除外した。この反応液を真空凍結乾燥機によって完全に乾燥させ、専用のサンプルバッファー（パーキンエルマー社製） $20 \mu\text{L}$ に浮遊させる。更に、攪拌後遠心沈殿させ $95^\circ\text{C}$ で2分間の加熱操作を行い、急冷後オートシーケンサー（ABI Genetic analyzer 310）で解析した。

次いで、第1プライマーによって決定された塩基配列を用いて、その塩基配列の3'側に新たなシーケンス用のプライマー（第2プライマー）を設定した。この第2プライマーを用いて、前述と同様にサイクルシーケンシングキットでラベリング反応を行った。反応後、前述と同様の操作を行い、オートシーケンサーで塩基配列を解析した。このように、毎回決定した塩基配列の3'側にシーケンス用プライマーを設定し、塩基配列の決定を行った。これを繰り返し、11種類のSRSV関連ウイルス構造遺伝子の5'末端から3'末端まで塩基配列（配列番号12～配列番号22）を決定した。このうち、配列番号15（Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP株）、配列番号20（Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP株）、配列番号21（Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP株）及び配列番号22（Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP株）で示される塩基配列は、これまでに報告されていない新規な配列であることが確認された。

### 実施例3 中空ウイルス粒子を産生する組換えバキュロウイルスの作製

#### (1) トランスファーベクターの構築

実施例1(3)で得られた構造遺伝子領域を組み込んだプラスミドを構造遺伝子領域を切断しない制限酵素で消化し、アガロースゲル電気泳動法によって分離後、構造遺伝子領域をSuprec™-01 (TAKARA)により回収した。次いで

、回収した遺伝子断片を、同じ制限酵素で消化したバキュロウイルストランスファーベクター pVL1393 (INVITROGEN社製) に組み込み、トランスファーベクターを作製した。

#### (2) 組換えバキュロウイルスの作製

0.5  $\mu$ g のバキュロウイルスDNA (Baculo-Gold) と1  $\mu$ g の(1) で得られたトランスファーベクターを8  $\mu$ L の蒸留水に溶解し、2倍希釈した等量のリポフェクチンと混合して室温で15分間放置する。昆虫細胞用培地 E x - c e l l 400 に懸濁した  $1 \times 10^5$  個の S f 9 細胞を26.5℃で30分間プラスチックシャーレ (直径3.5 cm) 内に吸着後、トランスファーベクターと B a c u l o - G o l d 混合液を細胞に滴下し26.5℃で培養した。24時間後、培養液を10%牛胎児血清及び2%BTB (GIBCO BRL社製) を含むTC100 (GIBCO BRL社製; 以後TC100) 培地に交換し、更に培養を継続した。

#### (3) 組換えバキュロウイルスの純化

(2) で得られた組換えバキュロウイルスを5日間培養した後、培養上清をTC100等の昆虫細胞培養用メディウムを用いて10倍に希釈した。その0.1 mLを取り、直径3.5 cmのプラスチックシャーレに培養した  $3 \times 10^6$  個の S f 9 細胞に接種した。26.5℃、60分間吸着後1%アガロースME (低融点アガロース) を含むTC100培養液2 mLを重層し26.5℃で培養した。更に、培養開始後4日目に0.005%のニュートラルレッドを含むTC100 1 mLを重層して26.5℃で培養した。翌日出現したプラークをマイクロチップでかき取り、TC100培地に懸濁した。

#### (4) 組換えバキュロウイルスのシードの作製と感染力価の測定

(3) で得られた懸濁液を  $1 \times 10^7$  個の S f 9 細胞に接種し、26.5℃、60分間吸着後TC100を加え、26.5℃で3から4日間培養した。この培養液を2500 rpm、10分間、4℃で遠心し、培養上清を回収した。この回収

した培養上清を、 $1 \times 10^7$ 個のSf9細胞に接種し、 $26.5^\circ\text{C}$ 、60分間吸着後TC100を加え、 $26.5^\circ\text{C}$ で3から4日間培養した。

次いで、この培養上清を直径3.5cmのプラスチックシャーレに培養した $3 \times 10^7$ 個のSf9細胞に接種し、 $26.5^\circ\text{C}$ で60分間吸着後1%アガロースME（低融点アガロース）を含むTC100培養液2mLを重層し $26.5^\circ\text{C}$ で培養した。次いで培養開始後4日目に0.005%のニュートラルレッドを含むTC100を1mL重層して $26.5^\circ\text{C}$ で培養した。翌日出現したプラークを計測し、組換えバキュロウイルスの感染力価を算出し、組換えバキュロウイルスシードの感染力価とした。

#### 実施例4 中空ウイルス粒子の作製

##### (1) 組換えバキュロウイルスを用いた構造蛋白の発現

Sf9昆虫細胞に対して組換えバキュロウイルスをM. O. I. (Multiplicity of infection) 1から10で感染させた。この時、組換えウイルス液を細胞に滴下させ、静かに振とうさせながら約60分程度吸着させた。その後、TC100昆虫細胞用培地を添加し、 $26.5^\circ\text{C}$ 、5から6日間培養した。

##### (2) 発現蛋白の同定

組換えウイルス感染培養上清を経時的に採取し、SDS-PAGEで分離後をクーマシーブルー染色で検出し、予想される分子量により発現蛋白の妥当性を確認した。また、SDS-PAGEで蛋白を分離後ニトロセルロース膜に転写し、SRSVの回復期血清によるウエスタンブロッティング法で発現蛋白を同定した。

##### (3) 中空ウイルス粒子の精製と回収

組換えバキュロウイルスシードをM. O. I. 1から10で感染させ、約60分吸着後、Excels 400を添加し、 $26.5^\circ\text{C}$ で3日間培養した。次いで、プロテアーゼ阻害剤、例えばペプスタチンA及びリユーベプチンを培養液に

最終濃度 1 mM になるように加え更に 2 から 3 日間培養を続けた。

培養後 2 5 0 0 r p m、1 0 分間、4℃で遠心し、培養上清を回収した。回収した培養液を 1 0 0 0 0 r p m で 3 0 分間遠心して組換えバキュロウイルスを取り除いた。この上清をベックマン SW 2 8 ローターで 2 5 0 0 0 r p m、4 時間遠心して中空ウイルス粒子を沈殿させた。次いで、上清を捨てた遠心管を逆さにして、完全に上清を除き、その後プロテアーゼ阻害剤を加えたグレースバッファー又は P B S ( - ) 0. 5 mL を各遠心管に加え、4℃一晩静置した。

静置後、加えておいたプロテアーゼ阻害剤入りグレースバッファーで中空ウイルス粒子を懸濁させ回収した。次いで、回収した中空ウイルス粒子に、C s C l を 3. 8 g 加えたプロテアーゼ阻害剤入りグレースバッファー又は P B S ( - ) を加え 1. 3 mL とし、1 6℃、3 5 0 0 0 r p m、2 4 から 4 8 時間超遠心した。超遠心後、中空ウイルス粒子が集まっている青白いバンドを回収し、プロテアーゼ阻害剤入りグレースバッファーを用いて 5 倍希釈後、ベックマン T L 1 0 0 . 3 ローターで 4 5 0 0 0 r p m、3 時間超遠心して、中空ウイルス粒子を沈殿させた。

沈殿させた中空ウイルス粒子をプロテアーゼ阻害剤入りグレースバッファー又は P B S ( - ) で可溶化した。次いで、1 0 % から 5 0 % のショ糖を含むプロテアーゼ阻害剤入りグレースバッファー溶液を 4 P A チューブに作り、そこに中空ウイルス粒子可溶化液を重層し、3 5 0 0 0 r p m、4 時間、4℃でショ糖密度勾配遠心を行った。遠心後、中空ウイルス粒子の青白いバンドを 2 6 G 針付きの 1 mL シリンジで回収し、精製 S R S V 中空ウイルス粒子とした。

精製 S R S V 中空ウイルス粒子をグレースバッファーで適宜希釈して、Bradford 法により蛋白量を測定した。

精製 S R S V 中空ウイルス粒子は、ウラニル酢酸でネガティブ染色し、電子顕微鏡で検鏡し中空ウイルス粒子を形成しているかを確認した (図 2 ~ 1 2) 。



## 実施例5 中空ウイルス粒子を用いた免疫抗体及び標識抗体の作製

## (1) 中空ウイルス粒子に対する免疫抗体の作製

Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/J P株、Hu/NLV/Seto 124/1989/J P株、Hu/NLV/Funabashi 258/1996/J P株、Hu/NLV/Chiba 407/1987/J P株、Hu/NLV/Narita 104/1997/J P株、Hu/NLV/Sanbu 809/1998/J P株、Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/J P株、Hu/NLV/Chitta 1876/1996/J P株、Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/J P株、Hu/NLV/Mie 7k/1994/J P株及びHu/NLV/Osaka 10-25/1999/J P株から得られた精製SRSV中空ウイルス粒子500 $\mu$ gを含む1mLのリン酸緩衝液(pH7.2)と1mLのフロインドの不完全アジュバントを混合し、3kgのニュージーランド白色ウサギに常法に従って免疫した。3週間後、0.25 $\mu$ gのSRSV中空ウイルス粒子を含むリン酸緩衝液(pH7.2)1mLとフロインドの不完全アジュバント1mLを混合して免疫した(追加免疫)。次いで、3週間後追加免疫と同様に免疫を行い、この約7から10日間後に全採血し、血清成分を分離した。

分離精製した血清を硫酸分画後、50mM Tris-HCl(pH7.6)で4℃、一晚透析した。次いで50mM Tris-HCl(pH7.6)で平衡化したDEAEセファロースクロマトグラフィーにかけ、UV波長280nmでモニタリングし、O.D.のピークを集めて、中空ウイルス粒子に対するDEAE精製IgG抗体(抗SRSV抗体)とした。

## (2) 標識抗体の作製

抗SRSV抗体を過ヨウ素酸改良法〔酵素免疫測定法、2:91(1982)〕でPOD標識した。即ちPODを4mg/mLになるように蒸留水で溶解し、

0. 1 M過ヨウ素酸ナトリウム 0. 2 mLを加え、室温で約 20 分間反応させた。次いで 1 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4. 0) で一晚透析した。透析後、0. 2 M炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9. 5) を 0. 02 mL 加え、pH 9. 5 にすると同時に抗 SRSV 抗体を 8 mg 加えた。

室温で約 2 時間反応させ、4 mg/mL 水酸化ホウ素ナトリウムを 0. 1 mL 加え、4℃で約 2 時間反応させた。反応後、10 mMリン酸バッファーを用いてセファクリル S-200 によるゲル濾過を行い、UV波長 280 nm でモニタリングして POD 標識抗 SRSV 抗体画分を集めた。

### (3) 抗 SRSV 抗体固相プレートの作製

抗 SRSV 抗体を炭酸バッファー (pH 9. 5) で各々 0. 5 – 10  $\mu$ g/mL 濃度に希釈し、ポリスチレン平型マイクロプレート (ヌンク社製) に 100  $\mu$ L/ウェルで分注し、4℃で一晩静置した。18 時間以上静置したマイクロプレートを最終濃度 0. 05 % Tween20 を含む PBS 200  $\mu$ L/ウェルで 3 ~ 4 回洗浄後、最終濃度 0. 5 % 牛血清アルブミン (BSA) と 0. 05 % Tween 20 を含む 10 mM PBS (pH 7. 2) 200  $\mu$ L/ウェル加えて 4℃一晩静置し、抗 SRSV 抗体固相マイクロプレートを作製した。

## 実施例 6 交差反応性

### (1) 抗原検出 ELISA

各精製 SRSV 中空ウイルス粒子をそれぞれ緩衝液 (10 mM PBS (pH 7. 2) に最終濃度 0. 2 % 牛血清アルブミン (BSA) と 0. 05 % Tween 20 を含む溶液) で 4 ng/mL から 0. 04 ng/mL まで希釈した。

次いで、希釈した各中空ウイルス粒子 (VLP) を、それぞれの抗 SRSV 抗体固相マイクロプレートのウェルに 100  $\mu$ L 加え、室温 60 分間反応させた。反応後、ウェルの反応液を吸引除去し、最終濃度 0. 05 % Tween20 を含む 10 mM PBS (pH 7. 2) をウェルに 200  $\mu$ L 加え、同様に吸引除去した。

この操作を少なくとも3回行った。洗浄後、緩衝液で20000倍に希釈した各血清型のPOD標識抗SRSV抗体を100 $\mu$ L/ウェル加え、室温60分間反応させた。洗浄後、過酸化水素を含むTMB溶液を100 $\mu$ L/ウェル加え、室温で30分間反応させた。反応後、0.6Nの硫酸を100 $\mu$ L/ウェル加え、ELISAオートリーダーでウェルの吸光度(450nm/630nm)を測定した。結果を表2に示す。

表2. 血清型間の交差反応性

精製 VLP	VLP 濃度 (ng/mL)	抗体固相プレート×POD (1段目 株名、 2段目 POD標識抗体希釈倍率)										
		124 20000	258 20000	407 20000	645 20000	104 20000	809 20000	754 20000	1876 20000	47 20000	7k 20000	10-25 20000
124	4	1.430	0.018	0.013	0.016	0.013	0.007	0.007	0.008	0.010	0.019	0.009
	0.4	0.192	0.011	0.010	0.011	0.014	0.007	0.007	0.008	0.011	0.018	0.009
	0.04	0.030	0.011	0.011	0.011	0.013	0.007	0.007	0.009	0.012	0.018	0.009
258	4	0.042	1.831	0.114	0.020	0.015	0.009	0.007	0.010	0.012	0.019	0.010
	0.4	0.013	0.270	0.022	0.013	0.016	0.009	0.007	0.009	0.013	0.019	0.011
	0.04	0.008	0.043	0.012	0.011	0.017	0.008	0.007	0.009	0.012	0.018	0.010
407	4	0.084	0.045	0.974	0.010	0.015	0.007	0.007	0.009	0.011	0.018	0.009
	0.4	0.016	0.012	0.134	0.010	0.013	0.007	0.008	0.009	0.011	0.018	0.009
	0.04	0.009	0.010	0.025	0.011	0.014	0.007	0.007	0.008	0.011	0.019	0.009
645	4	0.149	0.034	0.023	0.320	0.016	0.008	0.008	0.009	0.011	0.020	0.010
	0.4	0.024	0.013	0.012	0.045	0.017	0.009	0.008	0.009	0.012	0.019	0.011
	0.04	0.010	0.010	0.011	0.014	0.015	0.009	0.008	0.008	0.012	0.021	0.011
104	4	0.007	0.009	0.009	0.010	0.708	0.007	0.015	0.025	0.017	0.031	0.009
	0.4	0.010	0.009	0.009	0.010	0.094	0.008	0.008	0.011	0.013	0.020	0.009
	0.04	0.009	0.009	0.010	0.011	0.024	0.008	0.007	0.009	0.012	0.020	0.009
809	4	0.013	0.012	0.012	0.011	0.114	0.877	0.047	0.143	0.046	0.080	0.017
	0.4	0.010	0.010	0.011	0.011	0.030	0.134	0.013	0.033	0.018	0.028	0.013
	0.04	0.009	0.010	0.010	0.010	0.017	0.022	0.008	0.011	0.014	0.020	0.011
754	4	0.008	0.011	0.009	0.010	0.038	0.008	0.286	0.068	0.025	0.027	0.013
	0.4	0.008	0.009	0.010	0.011	0.017	0.008	0.038	0.015	0.013	0.020	0.010
	0.04	0.009	0.009	0.011	0.011	0.016	0.008	0.011	0.010	0.012	0.020	0.009
1876	4	0.010	0.012	0.011	0.011	0.026	0.009	0.013	0.728	0.023	0.025	0.012
	0.4	0.009	0.014	0.010	0.011	0.017	0.009	0.008	0.089	0.015	0.021	0.013
	0.04	0.011	0.010	0.010	0.012	0.016	0.010	0.007	0.017	0.014	0.019	0.011
47	4	0.008	0.008	0.009	0.010	0.017	0.007	0.008	0.011	0.324	0.021	0.014
	0.4	0.008	0.009	0.009	0.011	0.015	0.008	0.008	0.009	0.048	0.020	0.013
	0.04	0.008	0.009	0.009	0.011	0.014	0.008	0.008	0.008	0.017	0.022	0.011
7k	4	0.009	0.010	0.010	0.011	0.019	0.009	0.010	0.011	0.015	0.160	0.014
	0.4	0.009	0.011	0.010	0.011	0.016	0.008	0.008	0.008	0.015	0.035	0.016
	0.04	0.011	0.010	0.010	0.011	0.017	0.009	0.008	0.009	0.014	0.022	0.015
10-25	4	0.009	0.010	0.010	0.011	0.098	0.010	0.022	0.069	0.033	0.058	1.050
	0.4	0.007	0.009	0.010	0.011	0.026	0.009	0.009	0.020	0.018	0.026	0.163
	0.04	0.009	0.009	0.009	0.012	0.016	0.009	0.007	0.011	0.015	0.023	0.029
BLANK		0.009	0.011	0.010	0.011	0.016	0.009	0.008	0.009	0.017	0.022	0.016

表中、645はHu/NLV/Kashiwa 645/1999/JP株、1

24はHu/NLV/Seto 124/1989/J P株、258はHu/NLV/Funabashi 258/1996/J P株、407はHu/NLV/Chiba 407/1987/J P株、104はHu/NLV/Narita 104/1997/J P株、809はHu/NLV/Sanbu 809/1998/J P株、754はHu/NLV/Ichikawa 754/1998/J P株、1876はHu/NLV/Chitta 1876/1996/J P株、47はHu/NLV/Kashiwa 47/1997/J P株、7kはHu/NLV/Mie 7k/1994/J P株、10-25はHu/NLV/Osaka 10-25/1999/J P株を示す。

これより、異なる遺伝子型IとIIの間で交差反応性は見られなかったことはもちろん同一遺伝子型間においても交差反応は見られず、用いた11種類のウイスル株の血清型はそれぞれ異なることが確認された。

#### 試験例1 SRSVの遺伝型の判別

遺伝子型Iに属するSRSV(Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/J P株、Hu/NLV/Seto 124/1989/J P株、Hu/NLV/Funabashi 258/1996/J P株、Hu/NLV/Chiba 407/1987/J P株)の抗SRSV抗体を炭酸バッファー(pH9.5)で0.5-10 $\mu$ g/mL濃度に希釈混合し、ポリスチレン平型マイクロプレート(ヌンク社製)に100 $\mu$ L/ウェルで分注し、4℃で一晩静置した。18時間以上静置したマイクロプレートを最終濃度0.05% Tween20を含むPBS 200 $\mu$ L/ウェルで3~4回洗浄後、最終濃度0.5%牛血清アルブミン(BSA)と0.05% Tween20を含む10mM PBS(pH7.2)を200 $\mu$ L/ウェル加えて4℃一晩静置し、遺伝子型Iの各血清型に対する抗SRSV-IgG抗体を混合固相したマイクロプレート(I型プレート)を作製した。

次いで、遺伝子型IIに属するSRSV(Hu/NLV/Narita 104/

1997/J P株、Hu/NLV/Sanbu 809/1998/J P株、Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/J P株、Hu/NLV/Chitta 1876/1996/J P株、Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/J P株、Hu/NLV/Mie 7k/1994/J P株、Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/J P株)の抗SRSV抗体を同様に固相してII型プレートを作製した。

SRSV患者の便(0.5~1.0g)に9mLのPBSと1mLのダイフロンを加え、ホモジナイズした。次いで、19000gで20分間遠心してその上清を回収し、10%便乳剤とし、この10%便乳剤を緩衝液で等量希釈し、その希釈液をI及びII型プレートのウェルに100 $\mu$ L加え、室温60分間反応させた。反応後、ウェルの反応液を吸引除去し、最終濃度0.05% Tween20を含む10mM PBS (pH7.2)をウェルに200 $\mu$ L加え、同様に吸引除去した。この操作を少なくとも3回行った。洗浄後、緩衝液で20000倍に希釈した各血清型のPOD標識抗SRSV抗体を100 $\mu$ L/ウェル加え、室温60分間反応させた。洗浄後、過酸化水素を含むTMB溶液を100 $\mu$ L/ウェル加え、室温で30分間反応させた。反応後、0.6Nの硫酸を100 $\mu$ L/ウェル加え、ELISAオートリーダーでウェルの吸光度(450nm/630nm)を測定した。

その結果、遺伝子型IのSRSVに感染した患者の便検体15例は、14例がI型プレートにのみ反応しII型プレートに反応しなかった。遺伝子型IIのSRSVに感染した患者の便検体7例は、6例がI型プレートに反応しないでII型プレートにのみ反応し、遺伝子型の判別が実際に可能であることを確認した。

#### 試験例2 SRSVの血清型の判別

SRSV (Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/J P株、Hu/NLV/Seto 124/1989/J P株、Hu/NLV/Funabash

i 258/1996/JP株、Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP株、Hu/NLV/Narita 104/1997/JP株、Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP株、Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP株、Hu/NLV/Chitta 1876/1996/JP株、Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP株、Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP株及びHu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP株)の各抗SRSV抗体をそれぞれ単独に炭酸バッファー (pH 9.5) で0.5-10  $\mu$ g/mL濃度に希釈し、ポリスチレン平型マイクロプレート (ヌンク社製) に100  $\mu$ L/ウェルで分注し、4℃で一晩静置した。18時間以上静置したマイクロプレートを最終濃度0.05% Tween20を含むPBS 200  $\mu$ L/ウェルで3~4回洗浄後、最終濃度0.5%牛血清アルブミン (BSA) と0.05% Tween20を含む10mM PBS (pH 7.2) を200  $\mu$ L/ウェル加えて4℃で一晩静置し、抗SRSV抗体固相マイクロプレート (血清型別プレート) を作製した。

SRSV患者の便検体に対し、試験例1と同様にELISAを行った。結果を表3に示す。

表3. 臨床試験

検体総数: 41

本発明キットによる型別	検出検体数
Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/JP型	1
Hu/NLV/Seto 124/1989/JP型	7
Hu/NLV/Funabashi 258/1996/JP型	4
Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP型	1
Hu/NLV/Narita 104/1997/JP型	4
Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP型	12
Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP型	2
Hu/NLV/Chitta 1876/1996/JP型	3
Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP型	1
Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP型	1
Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP型	2
検出合計	38 (93%)

これにより、本発明のSRSV検出法によれば、93%という高い確率でSRSVを検出でき、且つその血清型を判別できることが明らかとなった。

尚、本発明のキットによりなされた型別は、PCR及び塩基配列の解析によりなされた型別と一致した(表4)。

表4. 血清型別の確認

検体総数: 38

本発明キットによる型別		PCR及び塩基配列の解析により型別された検体
Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/JP型	1検体	1
Hu/NLV/Seto 124/1989/JP型	7検体	7
Hu/NLV/Funabashi 258/1996/JP型	4検体	4
Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP型	1検体	1
Hu/NLV/Narita 104/1997/JP型	4検体	4
Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP型	12検体	12
Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP型	2検体	2
Hu/NLV/Chitta 1876/1996/JP型	3検体	3
Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP型	1検体	1
Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP型	1検体	1
Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP型	2検体	2

また、SRSV (Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/JP株、Hu/NLV/Seto 124/1989/JP株、Hu/NLV/Funabashi 258/1996/JP株、Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP株、Hu/NLV/Narita 104/1997/JP株、Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP株、Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP株、Hu/NLV/Chitta 1876/1996/JP株、Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP株、Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP株及びHu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP株) の各抗SRSV抗体を炭酸バッファー (pH9.5) で0.5-10 $\mu$ g/mL濃度に希釈しこれらを全て混合し、又は混合してから希

釈してものを用いて同様に抗SRSV抗体固相マイクロプレートを作製した。SRSVに感染した患者の便検体22例に対し、試験例1と同様にELISAを行ったところ、20例で検体中のSRSVを検出できた。

#### 産業上の利用可能性

本発明のSRSV検出キットによれば、簡易で且つ確実にこれまでに見出されている殆どのSRSV関連ウイルスを検出し、その血清型及び遺伝子型を判別することができる。従って、SRSVによる食中毒が発生した場合の感染ルートの特定、感染拡大の防止及び疫学調査等に有用である。



## 請求の範囲

1. 下記 (a) ~ (k) よりなる群から選択された一つの S R S V 関連ウイルス構成ペプチドに対する抗体を全て含有することを特徴とする S R S V 検出キット;

(a) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80% 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80% 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(c) 配列番号 3 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80% 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(d) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80% 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(e) 配列番号 5 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80% 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(f) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80% 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(g) 配列番号 7 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80% 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(h) 配列番号 8 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80% 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(i) 配列番号 9 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80% 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(j) 配列番号 10 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80% 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(k) 配列番号 11 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド。

2. 抗体が、中空ウイルス粒子を免疫して作製されたものである請求項 1 記載の SRSV 検出キット。

3. SRSV の血清型を判別するものである請求項 1 記載の SRSV 検出キット。

4. 下記 (a) ~ (d) よりなる群から選択された一つの SRSV 関連ウイルス構成ペプチドに対する抗体を全て含有することを特徴とする SRSV 遺伝子型判別のための SRSV 検出キット；

(a) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(c) 配列番号 3 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(d) 配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド。

5. 下記 (e) ~ (k) よりなる群から選択された一つの SRSV 関連ウイルス構成ペプチドに対する抗体を全て含有することを特徴とする SRSV 遺伝子型判別のための SRSV 検出キット；

(e) 配列番号 5 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(f) 配列番号 6 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して 80 % 以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(g) 配列番号 7 に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列

に対して80%以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(h) 配列番号8に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(i) 配列番号9に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(j) 配列番号10に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド、

(k) 配列番号11に示すアミノ酸配列を有するペプチド若しくは該アミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するペプチド又はそれらの部分ペプチド。

6. 抗体を担体に固定化した抗体固相担体でSRSVを捕捉するものである請求項1～5記載のキット。

7. 配列番号15で示される塩基配列又は該塩基配列の1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を有するHu/NLV/Chiba 407/1987/JP遺伝子。

8. 配列番号20で示される塩基配列又は該塩基配列の1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を有するHu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP遺伝子。

9. 配列番号21で示される塩基配列又は該塩基配列の1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を有するHu/NLV/Mie 7k/1994/JP遺伝子。

10. 配列番号22で示される塩基配列又は該塩基配列の1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を有するHu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP遺伝子。

## 要 約 書

本発明は、次の（a）～（k）；（a）配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有するペプチド等、（b）配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するペプチド等、（c）配列番号 3 に示すアミノ酸配列を有するペプチド等、（d）配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有するペプチド等、（e）配列番号 5 に示すアミノ酸配列を有するペプチド等、（f）配列番号 6 に示すアミノ酸配列を有するペプチド等、（g）配列番号 7 に示すアミノ酸配列を有するペプチド等、（h）配列番号 8 に示すアミノ酸配列を有するペプチド等、（i）配列番号 9 に示すアミノ酸配列を有するペプチド等、（j）配列番号 10 に示すアミノ酸配列を有するペプチド等、及び（k）配列番号 11 に示すアミノ酸配列を有するペプチド等、よりなる群から選択された一つの S R S V 関連ウイルス構成ペプチドに対する抗体を全て含有することを特徴とする S R S V 検出キットに関する。

当該キットを用いれば、簡易で且つ確実に殆どの S R S V 関連ウイルスを検出し、その血清型及び遺伝子型を判別することができる。

図 1

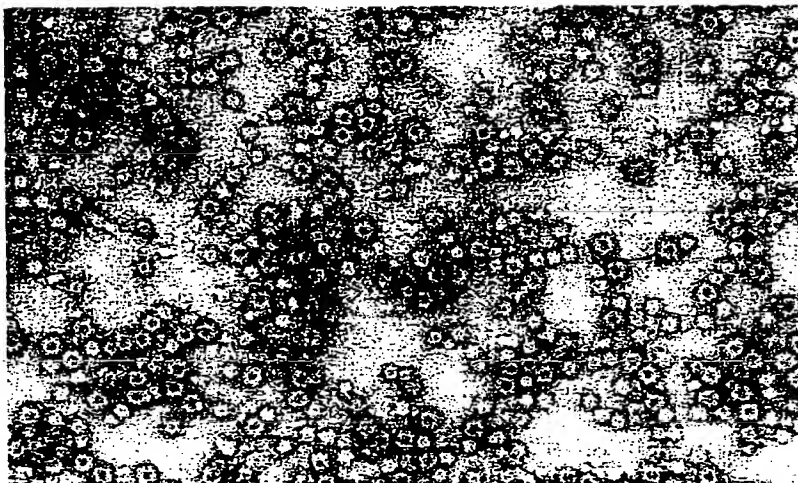


図 2

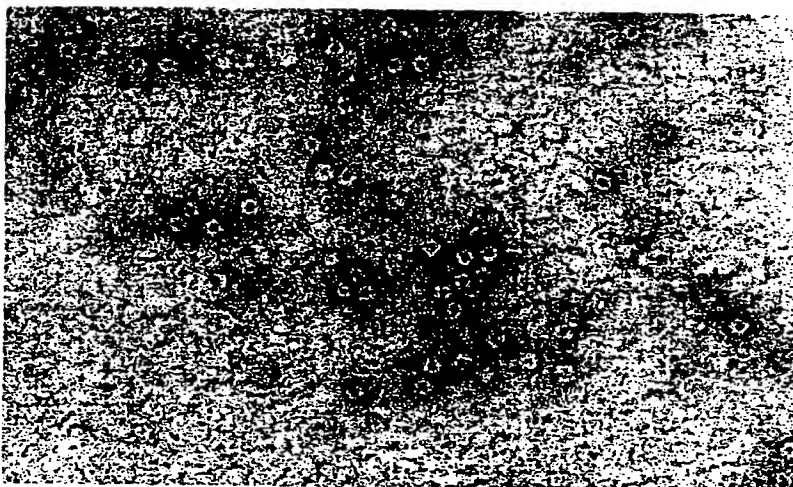




図 3

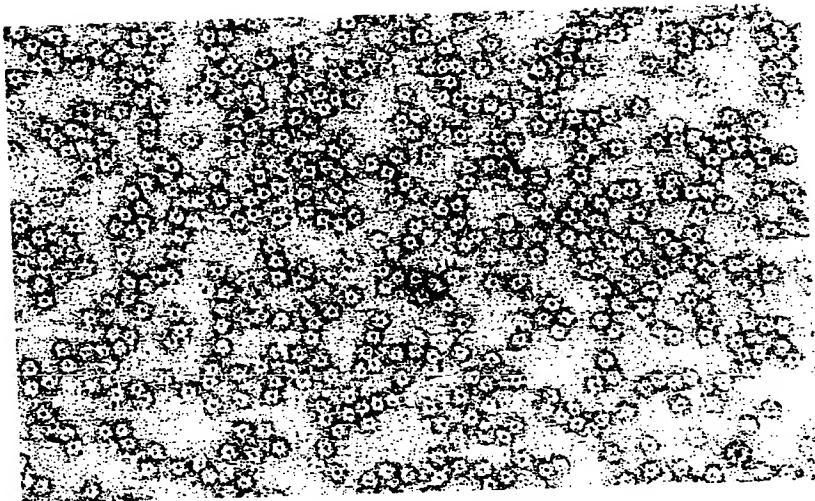


図 4

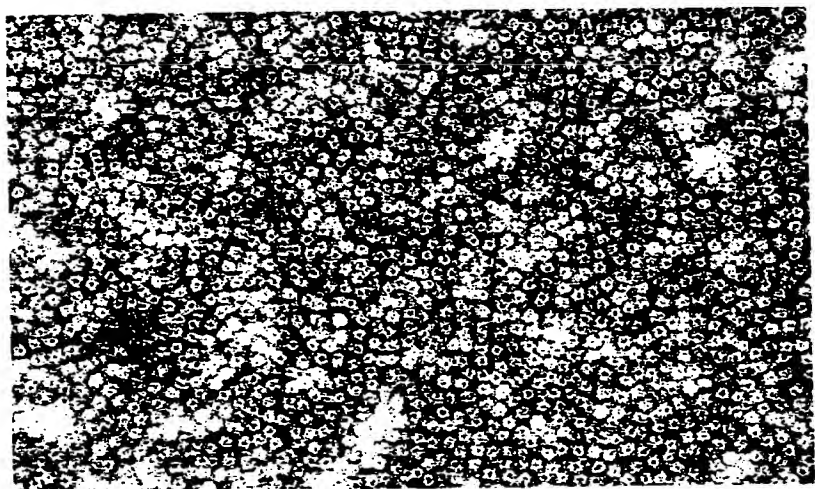






図 5

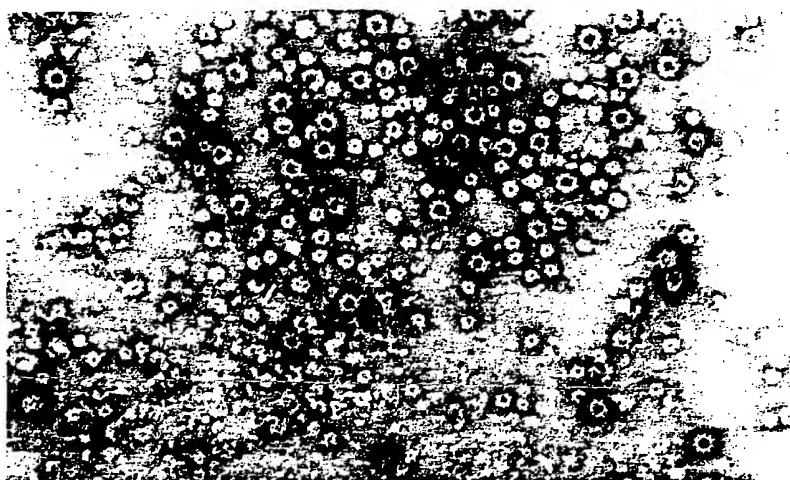


図 6

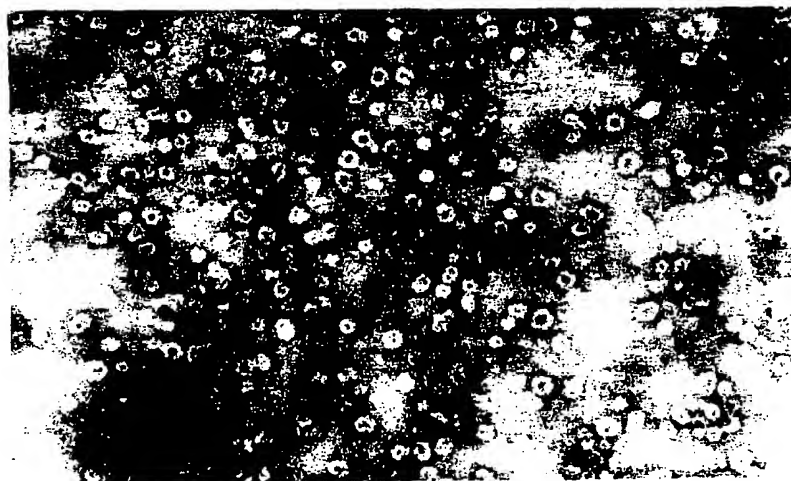




図 7

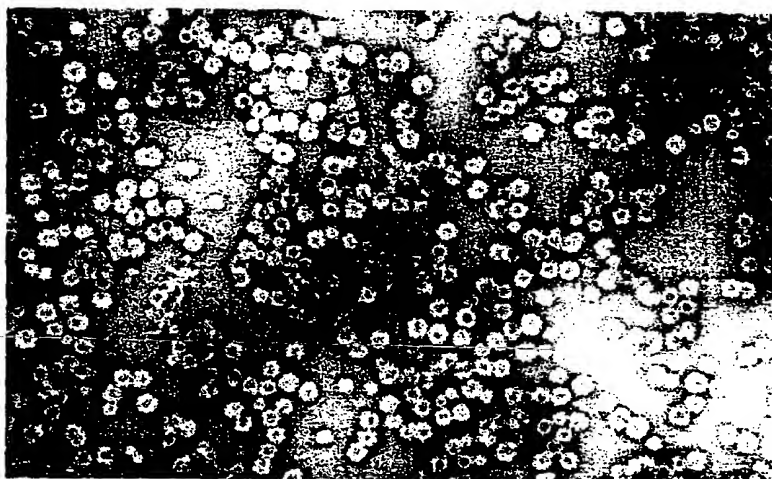


図 8

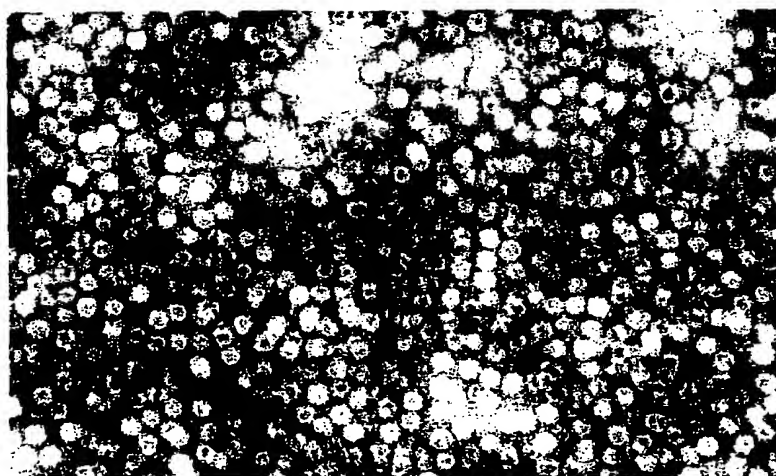




図 9

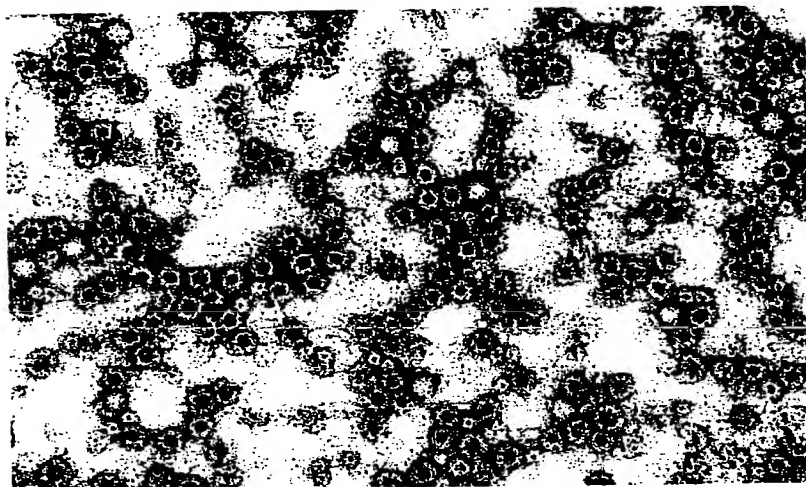


図 10

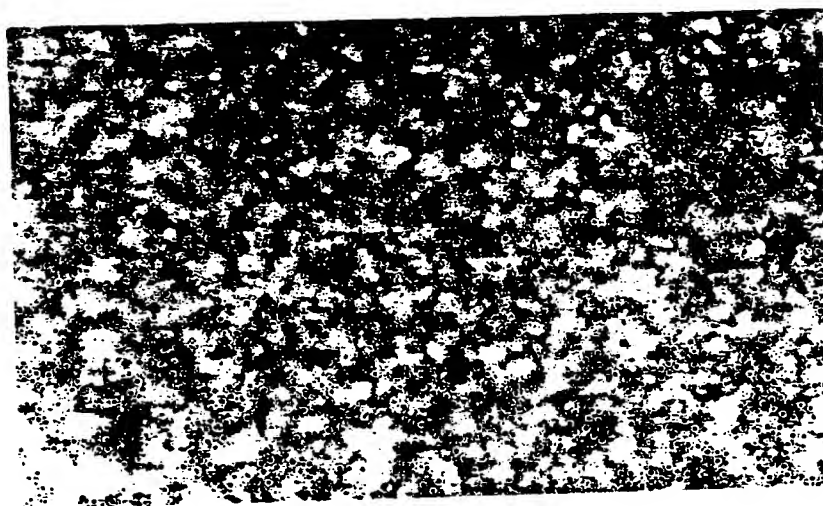
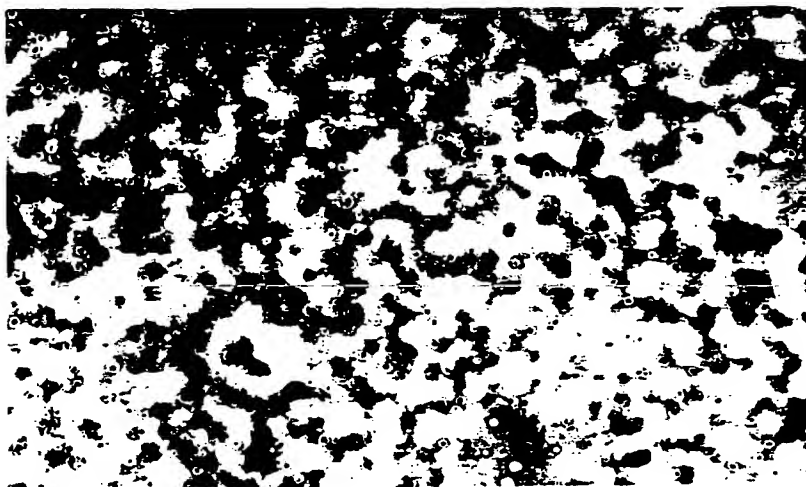




図 1 1







## SEQUENCE LISTING

<110> DENKA SEIKEN CO., LTD  
National Institute of Infectious Diseases

<120> Detection Kit for SRSV

<130> DK0001

<150> JP P1999-175928

<151> 1999-06-22

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 545

<212> PRT

<213> Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/JP

<400> 1

Met Met Met Ala Ser Lys Asp Ala Pro Thr Asn Met Asp Gly Thr Ser  
1 5 10 15

Gly Ala Gly Gln Leu Val Pro Glu Ala Asn Thr Ala Glu Pro Ile Ser  
20 25 30

Met Glu Pro Val Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Thr Ala Gly Gln  
35 40 45

Val Asn Met Ile Asp Pro Trp Ile Met Asn Asn Tyr Val Gln Ala Pro  
50 55 60

Gln Gly Glu Phe Thr Ile Ser Pro Asn Asn Thr Pro Gly Asp Ile Leu  
65 70 75 80

Phe Asp Leu Gln Leu Gly Pro His Leu Asn Pro Phe Leu Ser His Leu  
85 90 95

Ala Gln Met Tyr Asn Gly Trp Val Gly Asn Met Lys Val Lys Val Leu  
100 105 110

Leu Ala Gly Asn Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Ile Ser Cys Ile  
115 120 125



Pro Pro Gly Phe Ala Ala Gln Asn Ile Ser Ile Ala Gln Ala Thr Met  
 130 135 140  
 Phe Pro His Val Ile Ala Asp Val Arg Val Leu Glu Pro Ile Glu Val  
 145 150 155 160  
 Pro Leu Glu Asp Val Arg Asn Val Leu Phe His Asn Asn Asp Asn Ala  
 165 170 175  
 Pro Thr Met Arg Leu Val Cys Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ala Ser  
 180 185 190  
 Gly Ser Ser Ser Gly Thr Asp Pro Phe Val Ile Ala Gly Arg Val Leu  
 195 200 205  
 Thr Cys Pro Ser Pro Asp Phe Ser Phe Leu Phe Leu Val Pro Pro Asn  
 210 215 220  
 Val Glu Gln Lys Thr Lys Pro Phe Ser Val Pro Asn Leu Pro Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ser Asn Ser Arg Val Pro Ser Leu Ile Lys Ser Met Met Val  
 245 250 255  
 Ser Arg Asp His Gly Gln Met Val Gln Phe Gln Asn Gly Arg Val Thr  
 260 265 270  
 Leu Asp Gly Gln Leu Gln Gly Thr Thr Pro Thr Ser Ala Ser Gln Leu  
 275 280 285  
 Cys Lys Ile Arg Gly Ser Val Phe His Ala Asn Gly Gly Asn Gly Tyr  
 290 295 300  
 Asn Leu Thr Glu Leu Asp Gly Ser Pro Tyr His Ala Phe Glu Ser Pro  
 305 310 315 320  
 Ala Pro Ile Gly Phe Pro Asp Leu Gly Glu Cys Asp Trp His Met Glu  
 325 330 335  
 Ala Ser Pro Thr Thr Gln Phe Asn Thr Gly Asp Val Ile Lys Gln Ile  
 340 345 350  
 Asn Val Lys Gln Glu Ser Ala Phe Ala Pro His Leu Gly Thr Ile Gln  
 355 360 365  
 Ala Asp Gly Leu Ser Asp Val Ser Val Asn Thr Asn Met Ile Ala Lys



370                      375                      380  
 Leu Gly Trp Val Ser Pro Val Ser Asp Gly His Arg Gly Asp Val Asp  
 385                      390                      395                      400  
 Pro Trp Val Ile Pro Arg Tyr Gly Ser Thr Leu Thr Glu Ala Ala Gln  
                     405                      410                      415  
 Leu Ala Pro Pro Ile Tyr Pro Pro Gly Phe Gly Glu Ala Ile Val Phe  
                     420                      425                      430  
 Phe Met Ser Asp Phe Pro Ile Ala His Gly Thr Asn Gly Leu Ser Val  
                     435                      440                      445  
 Pro Cys Thr Ile Pro Gln Glu Phe Val Thr His Phe Val Asn Glu Gln  
                     450                      455                      460  
 Ala Pro Thr Arg Gly Glu Ala Ala Leu Leu His Tyr Leu Asp Pro Asp  
 465                      470                      475                      480  
 Thr His Arg Asn Leu Gly Glu Phe Lys Leu Tyr Pro Glu Gly Phe Met  
                     485                      490                      495  
 Thr Cys Val Pro Asn Ser Ser Gly Thr Gly Pro Gln Thr Leu Pro Ile  
                     500                      505                      510  
 Asn Gly Val Phe Val Phe Val Ser Trp Val Ser Arg Phe Tyr Gln Leu  
                     515                      520                      525  
 Lys Pro Val Gly Thr Ala Gly Pro Ala Cys Arg Leu Gly Ile Arg Arg  
                     530                      535                      540  
 Ser  
 545

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 530

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Hu/NLV/Seto 124/1989/JP

&lt;400&gt; 2

Met Met Met Ala Ser Lys Asp Ala Thr Ser Ser Val Asp Gly Ala Ser  
 1                      5                      10                      15

Gly Ala Gly Gln Leu Val Pro Glu Val Asn Ala Ser Asp Pro Leu Ala



20	25	30
Met Asp Pro Val Ala Gly Ser Ser Thr Ala Val Ala Thr Ala Gly Gln		
35	40	45
Val Asn Pro Ile Asp Pro Trp Ile Ile Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro		
50	55	60
Gln Gly Glu Phe Thr Ile Ser Pro Asn Asn Thr Pro Gly Gly Val Leu		
65	70	75
Phe Asp Leu Ser Leu Gly Pro His Leu Asn Pro Phe Leu Leu His Leu		
85	90	95
Ser Gln Met Tyr Asn Gly Trp Val Gly Asn Met Arg Val Arg Ile Met		
100	105	110
Leu Ala Gly Asn Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Val Ser Cys Ile		
115	120	125
Pro Pro Gly Phe Gly Ser His Asn Leu Thr Ile Ala Gln Ala Thr Leu		
130	135	140
Phe Pro His Val Ile Ala Asp Val Arg Thr Leu Asp Pro Ile Glu Val		
145	150	155
Pro Leu Glu Asp Val Arg Asn Val Leu Phe His Asn Asn Asp Arg Asn		
165	170	175
Gln Gln Thr Met Arg Leu Val Cys Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Thr		
180	185	190
Gly Gly Gly Thr Gly Asp Ser Phe Val Val Ala Gly Arg Val Met Thr		
195	200	205
Cys Pro Ser Pro Asp Phe Asn Phe Leu Phe Leu Val Pro Pro Thr Val		
210	215	220
Glu Gln Lys Thr Arg Pro Phe Thr Leu Pro Asn Leu Pro Leu Ser Ser		
225	230	235
Leu Ser Asn Ser Arg Ala Pro Leu Pro Ile Ser Gly Met Gly Ile Ser		
245	250	255
Pro Asp Asn Val Gln Ser Val Gln Phe Gln Asn Gly Arg Cys Thr Leu		
260	265	270





Asp Gly Arg Leu Val Gly Thr Thr Pro Val Ser Leu Ser His Val Ala  
 275 280 285

Lys Ile Arg Gly Thr Ser Asn Gly Thr Val Ile Asn Leu Thr Glu Leu  
 290 295 300

Asp Gly Thr Pro Phe His Pro Phe Glu Gly Pro Ala Pro Ile Gly Phe  
 305 310 315 320

Pro Asp Leu Gly Gly Cys Asp Trp His Ile Asn Met Thr Gln Phe Gly  
 325 330 335

His Ser Ser Gln Thr Gln Tyr Asp Val Asp Thr Thr Pro Asp Thr Phe  
 340 345 350

Val Pro His Leu Gly Ser Ile Gln Ala Asn Gly Ile Gly Ser Gly Asn  
 355 360 365

Tyr Ile Gly Val Leu Ser Trp Val Ser Pro Pro Ser His Pro Ser Gly  
 370 375 380

Ser Gln Val Asp Leu Trp Lys Ile Pro Asn Tyr Gly Ser Ser Ile Thr  
 385 390 395 400

Glu Ala Thr His Leu Ala Pro Ser Val Tyr Pro Pro Gly Phe Gly Glu  
 405 410 415

Val Leu Val Phe Phe Met Ser Lys Ile Pro Gly Pro Gly Ala Tyr Ser  
 420 425 430

Leu Pro Cys Leu Leu Pro Gln Glu Tyr Ile Ser His Leu Ala Ser Glu  
 435 440 445

Gln Ala Pro Thr Val Gly Glu Ala Ala Leu Leu His Tyr Val Asp Pro  
 450 455 460

Asp Thr Gly Arg Thr Leu Gly Glu Phe Lys Ala Tyr Pro Asp Gly Phe  
 465 470 475 480

Leu Thr Cys Val Pro Asn Gly Ala Ser Ser Gly Pro Gln Gln Leu Pro  
 485 490 495

Ile Asn Gly Val Phe Val Phe Val Ser Trp Val Ser Arg Phe Tyr Gln  
 500 505 510



Leu Lys Pro Val Gly Thr Ala Ser Ser Ala Arg Gly Arg Leu Gly Leu  
 515 520 525

Arg Arg  
 530

<210> 3

<211> 545

<212> PRT

<213> Hu/NLV/Funabashi 258/1996/JP

<400> 3

Met Met Met Ala Ser Lys Asp Ala Pro Gln Ser Ala Asp Gly Ala Ser  
 1 5 10 15

Gly Ala Gly Gln Leu Val Pro Glu Val Asn Thr Ala Asp Pro Leu Pro  
 20 25 30

Met Glu Pro Val Ala Gly Pro Thr Thr Ala Val Ala Thr Ala Gly Gln  
 35 40 45

Val Asn Met Ile Asp Pro Trp Ile Val Asn Asn Phe Val Gln Ser Pro  
 50 55 60

Gln Gly Glu Phe Thr Ile Ser Pro Asn Asn Thr Pro Gly Asp Ile Leu  
 65 70 75 80

Phe Asp Leu Gln Leu Gly Pro His Leu Asn Pro Phe Leu Ser His Leu  
 85 90 95

Ser Gln Met Tyr Asn Gly Trp Val Gly Asn Met Arg Val Arg Ile Leu  
 100 105 110

Leu Ala Gly Asn Ala Phe Ser Ala Gly Lys Ile Ile Val Cys Cys Val  
 115 120 125

Pro Pro Gly Phe Thr Ser Ser Ser Leu Thr Ile Ala Gln Ala Thr Leu  
 130 135 140

Phe Pro His Val Ile Ala Asp Val Arg Thr Leu Glu Pro Ile Glu Met  
 145 150 155 160

Pro Leu Glu Asp Val Arg Asn Val Leu Tyr His Thr Asn Asp Asn Gln  
 165 170 175



Pro Thr Met Arg Leu Val Cys Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Thr Gly  
 180 185 190  
 Gly Gly Ser Gly Asn Ser Asp Ser Phe Val Val Ala Gly Arg Val Leu  
 195 200 205  
 Thr Ala Pro Ser Ser Asp Phe Ser Phe Leu Phe Leu Val Pro Pro Thr  
 210 215 220  
 Ile Glu Gln Lys Thr Arg Ala Phe Thr Val Pro Asn Ile Pro Leu Gln  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Ser Asn Ser Arg Phe Pro Ser Leu Ile Gln Gly Met Ile Leu  
 245 250 255  
 Ser Pro Asp Ala Ser Gln Val Val Gln Phe Gln Asn Gly Arg Cys Leu  
 260 265 270  
 Ile Asp Gly Gln Leu Leu Gly Thr Thr Pro Ala Thr Ser Gly Gln Leu  
 275 280 285  
 Phe Arg Val Arg Gly Lys Ile Asn Gln Gly Ala Arg Thr Leu Asn Leu  
 290 295 300  
 Thr Glu Val Asp Gly Lys Pro Phe Met Ala Phe Asp Ser Pro Ala Pro  
 305 310 315 320  
 Val Gly Phe Pro Asp Phe Gly Lys Cys Asp Trp His Met Arg Ile Ser  
 325 330 335  
 Lys Thr Pro Asn Asn Thr Ser Ser Gly Asp Pro Met Arg Ser Val Ser  
 340 345 350  
 Val Gln Thr Asn Val Gln Gly Phe Val Pro His Leu Gly Ser Ile Gln  
 355 360 365  
 Phe Asp Glu Val Phe Asn His Pro Thr Gly Asp Tyr Ile Gly Thr Ile  
 370 375 380  
 Glu Trp Ile Ser Gln Pro Ser Thr Pro Pro Gly Thr Asp Ile Asn Leu  
 385 390 395 400  
 Trp Glu Ile Pro Asp Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Gln Ala Ala Asn Leu  
 405 410 415  
 Ala Pro Pro Val Phe Pro Pro Gly Phe Gly Glu Ala Leu Val Tyr Phe



420                      425                      430  
 Val Ser Ala Phe Pro Gly Pro Asn Asn Arg Ser Ala Pro Asn Asp Val  
          435                      440                      445  
 Pro Cys Leu Leu Pro Gln Glu Tyr Ile Thr His Phe Val Ser Glu Gln  
          450                      455                      460  
 Ala Pro Thr Met Gly Asp Ala Ala Leu Leu His Tyr Val Asp Pro Asp  
 465                      470                      475                      480  
 Thr Asn Arg Asn Leu Gly Glu Phe Lys Leu Tyr Pro Gly Gly Tyr Leu  
                          485                      490                      495  
 Thr Cys Val Pro Asn Gly Val Gly Ala Gly Pro Gln Gln Leu Pro Leu  
                          500                      505                      510  
 Asn Gly Val Phe Leu Phe Val Ser Trp Val Ser Arg Phe Tyr Gln Leu  
                          515                      520                      525  
 Lys Pro Val Gly Thr Ala Ser Thr Ala Arg Ser Arg Leu Gly Val Arg  
                          530                      535                      540  
 Arg Ile  
 545

<210> 4  
 <211> 544  
 <212> PRT  
 <213> Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP

<400> 4  
 Met Met Met Ala Ser Lys Asp Ala Thr Pro Ser Ala Asp Gly Ala Thr  
       1                      5                      10                      15  
 Gly Ala Gly Gln Leu Val Pro Glu Val Asn Thr Ala Asp Pro Ile Pro  
                          20                      25                      30  
 Ile Asp Pro Val Ala Gly Ser Ser Thr Ala Leu Ala Thr Ala Gly Gln  
                          35                      40                      45  
 Val Asn Leu Ile Asp Pro Trp Ile Ile Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro  
                          50                      55                      60  
 Gln Gly Glu Phe Thr Ile Ser Pro Asn Asn Thr Pro Gly Asp Val Leu





65		70		75		80
Phe Asp Leu Gln Leu Gly Pro His Leu Asn Pro Phe Leu Ser His Leu						
	85		90		95	
Ser Gln Met Tyr Asn Gly Trp Val Gly Asn Met Arg Val Arg Val Val						
	100		105		110	
Leu Ala Gly Asn Ala Phe Thr Ala Gly Lys Val Ile Ile Cys Cys Val						
	115		120		125	
Pro Pro Gly Phe Gln Ser Arg Thr Leu Ser Ile Ala Gln Ala Thr Leu						
	130		135		140	
Phe Pro His Val Ile Ala Asp Val Arg Thr Leu Asp Pro Val Glu Val						
	145		150		155	160
Pro Leu Glu Asp Val Arg Asn Val Leu Tyr His Asn Asn Asp Thr Gln						
	165		170		175	
Pro Thr Met Arg Leu Leu Cys Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Thr Gly						
	180		185		190	
Gly Ala Ser Gly Gly Thr Asp Ser Phe Val Val Ala Gly Arg Val Leu						
	195		200		205	
Thr Cys Pro Gly Pro Asp Phe Asn Phe Leu Phe Leu Val Pro Pro Thr						
	210		215		220	
Val Glu Gln Lys Thr Arg Pro Phe Thr Val Pro Asn Ile Pro Leu Lys						
	225		230		235	240
Tyr Leu Ser Asn Ser Arg Ile Pro Asn Pro Ile Glu Gly Met Ser Leu						
	245		250		255	
Ser Pro Asp Gln Thr Gln Asn Val Gln Phe Gln Asn Gly Arg Cys Thr						
	260		265		270	
Ile Asp Gly Gln Pro Leu Gly Thr Thr Pro Val Ser Val Ser Gln Leu						
	275		280		285	
Cys Lys Phe Arg Gly Arg Ile Thr Ser Gly Gln Arg Val Leu Asn Leu						
	290		295		300	
Thr Glu Leu Asp Gly Ser Pro Phe Met Ala Phe Ala Ala Pro Ala Pro						
	305		310		315	320







&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 539

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Hu/NLV/Narita 104/1997/JP

&lt;400&gt; 5

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Asn Pro Ser Asp Gly Ser Thr Ala  
 1 5 10 15

Asn Leu Val Pro Glu Val Asn Asn Glu Val Met Ala Leu Glu Pro Val  
 20 25 30

Val Gly Ala Ala Ile Ala Ala Pro Val Ala Gly Gln Gln Asn Val Ile  
 35 40 45

Asp Pro Trp Ile Arg Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro Gly Gly Glu Phe  
 50 55 60

Thr Val Ser Pro Arg Asn Ala Pro Gly Glu Ile Leu Trp Ser Ala Pro  
 65 70 75 80

Leu Gly Pro Asp Leu Asn Pro Tyr Leu Ser His Leu Ala Arg Met Tyr  
 85 90 95

Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Phe Glu Val Gln Val Ile Leu Ala Gly Asn  
 100 105 110

Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Phe Ala Ala Val Pro Pro Asn Phe  
 115 120 125

Pro Thr Glu Gly Leu Ser Pro Ser Gln Val Thr Met Phe Pro His Ile  
 130 135 140

Ile Val Asp Val Arg Gln Leu Glu Pro Val Leu Ile Pro Leu Pro Asp  
 145 150 155 160

Val Arg Asn Asn Phe Tyr His Tyr Asn Gln Ser Asn Asp Ser Thr Ile  
 165 170 175

Lys Leu Ile Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ala Asn Asn Ala Gly  
 180 185 190

Asp Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Ser Pro  
 195 200 205



Asp Phe Asp Phe Ile Phe Leu Val Pro Pro Thr Val Glu Ser Arg Thr  
 210 215 220  
 Lys Pro Phe Thr Val Pro Ile Leu Thr Val Glu Glu Met Ser Asn Ser  
 225 230 235 240  
 Arg Phe Pro Ile Pro Leu Glu Lys Leu Tyr Thr Gly Pro Ser Ser Ala  
 245 250 255  
 Phe Val Val Gln Pro Gln Asn Gly Arg Cys Thr Thr Asp Gly Val Leu  
 260 265 270  
 Leu Gly Thr Thr Gln Leu Ser Ala Val Asn Ile Cys Thr Phe Arg Gly  
 275 280 285  
 Asp Val Thr His Ile Ala Gly Ser His Asp Tyr Thr Met Asn Leu Ala  
 290 295 300  
 Ser Gln Asn Trp Ser Asn Tyr Asp Pro Thr Glu Glu Ile Pro Ala Pro  
 305 310 315 320  
 Leu Gly Thr Pro Asp Phe Val Gly Lys Ile Gln Gly Met Leu Thr Gln  
 325 330 335  
 Thr Thr Arg Glu Asp Gly Ser Thr Arg Ala His Lys Ala Thr Val Ser  
 340 345 350  
 Thr Gly Ser Val His Phe Thr Pro Lys Leu Gly Ser Val Gln Tyr Thr  
 355 360 365  
 Thr Asp Thr Asn Asn Asp Phe Gln Thr Gly Gln Asn Thr Lys Phe Thr  
 370 375 380  
 Pro Val Gly Val Ile Gln Asp Gly Asn Asn His Gln Asn Glu Pro Gln  
 385 390 395 400  
 Gln Trp Val Leu Pro Asn Tyr Ser Gly Arg Thr Gly His Asn Val His  
 405 410 415  
 Leu Ala Pro Ala Val Ala Pro Thr Phe Pro Gly Glu Gln Leu Leu Phe  
 420 425 430  
 Phe Arg Ser Thr Met Pro Gly Cys Ser Gly Tyr Pro Asn Met Asn Leu  
 435 440 445  
 Asp Cys Leu Leu Pro Gln Glu Trp Val Gln His Phe Cys Gln Glu Ala





450                      455                      460  
 Ala Pro Ala Gln Ser Asp Val Ala Leu Leu Arg Phe Val Asn Pro Asp  
 465                      470                      475                      480  
 Thr Gly Arg Val Leu Phe Glu Cys Lys Leu His Lys Ser Gly Tyr Val  
                     485                      490                      495  
 Thr Val Ala His Thr Gly Pro His Asp Leu Val Ile Pro Pro Asn Gly  
                     500                      505                      510  
 Tyr Phe Arg Phe Asp Ser Trp Val Asn Gln Phe Tyr Thr Leu Ala Pro  
                     515                      520                      525  
 Met Gly Asn Gly Ala Gly Arg Arg Arg Ala Leu  
                     530                      535

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 548

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP

&lt;400&gt; 6

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ala Pro Ser Asn Asp Gly Ala Ala  
   1                    5                    10                    15  
 Gly Leu Val Pro Glu Ile Asn Asn Glu Ala Met Ala Leu Asp Pro Val  
                     20                    25                    30  
 Ala Gly Ala Ala Ile Ala Ala Pro Leu Thr Gly Gln Gln Asn Ile Ile  
                     35                    40                    45  
 Asp Pro Trp Ile Met Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro Gly Gly Glu Phe  
                     50                    55                    60  
 Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Val Leu Leu Asn Leu Glu  
   65                    70                    75                    80  
 Leu Gly Pro Glu Ile Asn Pro Tyr Leu Ala His Leu Ala Arg Met Tyr  
                     85                    90                    95  
 Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Phe Glu Val Gln Val Val Leu Ala Gly Asn  
                     100                    105                    110  
 Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Phe Ala Ala Ile Pro Pro Asn Phe



115	120	125
Pro Ile Asp Asn Leu Ser Ala Ala Gln Ile Thr Met Cys Pro His Val		
130	135	140
Ile Val Asp Val Arg Gln Leu Glu Pro Val Asn Leu Pro Met Pro Asp		
145	150	155
Val Arg Asn Asn Phe Phe His Tyr Asn Gln Gly Ser Asp Ser Arg Leu		
165	170	175
Arg Leu Ile Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ala Asn Asn Ser Gly		
180	185	190
Asp Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Ser Pro		
195	200	205
Asp Phe Ser Phe Asn Phe Leu Val Pro Pro Thr Val Glu Ser Lys Thr		
210	215	220
Lys Pro Phe Thr Leu Pro Ile Leu Thr Ile Ser Glu Met Ser Asn Ser		
225	230	235
Arg Phe Pro Val Pro Ile Glu Ser Leu His Thr Ser Pro Thr Glu Asn		
245	250	255
Ile Val Val Gln Cys Gln Asn Gly Arg Val Thr Leu Asp Gly Glu Leu		
260	265	270
Met Gly Thr Thr Gln Leu Leu Pro Ser Gln Ile Cys Ala Phe Arg Gly		
275	280	285
Val Leu Thr Arg Ser Thr Ser Arg Ala Ser Asp Gln Ala Asp Thr Ala		
290	295	300
Thr Pro Arg Leu Phe Asn Tyr Tyr Trp His Val Gln Leu Asp Asn Leu		
305	310	315
Asn Gly Thr Pro Tyr Asp Pro Ala Glu Asp Ile Pro Gly Pro Leu Gly		
325	330	335
Thr Pro Asp Phe Arg Gly Lys Val Phe Gly Val Ala Ser Gln Arg Asn		
340	345	350
Leu Asp Ser Thr Thr Arg Ala His Glu Ala Lys Val Asp Thr Thr Ala		
355	360	365



Gly Arg Phe Thr Pro Lys Leu Gly Ser Leu Glu Ile Ser Thr Asp Ser  
370 375 380

Asp Asp Phe Asp Gln Asn Gln Pro Thr Lys Phe Thr Pro Val Gly Ile  
385 390 395 400

Gly Val Asp Asn Glu Ala Glu Phe Gln Gln Trp Ser Leu Pro Asp Tyr  
405 410 415

Ser Gly Gln Phe Thr His Asn Met Asn Leu Ala Pro Ala Val Ala Pro  
420 425 430

Asn Phe Pro Gly Glu Gln Leu Leu Phe Phe Arg Ser Gln Leu Pro Ser  
435 440 445

Ser Gly Gly Arg Ser Asn Gly Val Leu Asp Cys Leu Val Pro Gln Glu  
450 455 460

Trp Val Gln His Phe Tyr Gln Glu Ser Ala Pro Ala Gln Thr Gln Val  
465 470 475 480

Ala Leu Val Arg Tyr Val Asn Pro Asp Thr Gly Lys Val Leu Phe Glu  
485 490 495

Ala Lys Leu His Lys Leu Gly Phe Met Thr Ile Ala Asn Asn Gly Asp  
500 505 510

Ser Pro Ile Thr Val Pro Pro Asn Gly Tyr Phe Arg Phe Glu Ser Trp  
515 520 525

Val Asn Pro Phe Tyr Thr Leu Ala Pro Met Gly Thr Gly Asn Gly Arg  
530 535 540

Arg Arg Ile Gln  
545

<210> 7

<211> 540

<212> PRT

<213> Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP

<400> 7

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Thr Pro Ser Asn Asp Gly Ala Ala  
1 5 10 15



Gly Leu Val Pro Glu Ser Asn Asn Glu Ala Met Ala Leu Glu Pro Val  
                   20                  25                  30

Val Gly Ala Ser Leu Ala Ala Pro Val Thr Gly Gln Thr Asn Ile Ile  
                   35                  40                  45

Asp Pro Trp Ile Arg Thr Asn Phe Val Gln Ala Pro Asn Gly Glu Phe  
                   50                  55                  60

Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Ile Leu Val Asn Leu Glu  
                   65                  70                  75                  80

Leu Gly Pro Glu Leu Asn Pro Tyr Leu Ala His Leu Ala Arg Met Tyr  
                   85                  90                  95

Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Met Glu Val Gln Val Met Leu Ala Gly Asn  
                   100                  105                  110

Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Phe Ala Ala Val Pro Pro Tyr Phe  
                   115                  120                  125

Pro Val Glu Asn Leu Ser Pro Ser Gln Ile Thr Met Phe Pro His Val  
                   130                  135                  140

Ile Ile Asp Val Arg Thr Leu Glu Pro Val Leu Leu Pro Met Pro Asp  
                   145                  150                  155                  160

Val Arg Ser Thr Leu Phe His Phe Asn Gln Lys Asp Glu Pro Lys Met  
                   165                  170                  175

Arg Leu Val Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ser Asn Gly Ser Gly  
                   180                  185                  190

Asp Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Ile Leu Thr Arg Pro Ser Pro  
                   195                  200                  205

Glu Phe Asp Phe Thr Tyr Leu Val Pro Pro Thr Val Glu Ser Lys Thr  
                   210                  215                  220

Lys Pro Phe Thr Leu Pro Val Leu Thr Leu Gly Glu Leu Ser Asn Ser  
                   225                  230                  235                  240

Arg Phe Pro Leu Ser Ile Asp Glu Met Val Thr Ser Pro Asn Glu Ser  
                   245                  250                  255





Ile Val Val Gln Pro Gln Asn Gly Arg Val Thr Leu Asp Gly Glu Leu  
 260 265 270

Leu Gly Thr Thr Gln Leu Gln Ala Cys Asn Ile Cys Ser Ile Arg Gly  
 275 280 285

Lys Val Thr Gly Gln Val Pro Ser Glu Gln His Met Trp Asn Leu Glu  
 290 295 300

Ile Thr Asn Leu Asn Gly Thr Gln Phe Asp Pro Thr Asp Asp Val Pro  
 305 310 315 320

Ala Pro Leu Gly Val Pro Asp Phe Ala Gly Glu Val Phe Gly Val Leu  
 325 330 335

Ser Gln Arg Asn Arg Gly Glu Ser Asn Pro Ala Asn Arg Ala His Asp  
 340 345 350

Ala Val Val Ala Thr Tyr Ser Asp Lys Tyr Thr Pro Lys Leu Gly Leu  
 355 360 365

Val Gln Ile Gly Thr Trp Asn Thr Asn Asp Val Glu Asn Gln Pro Thr  
 370 375 380

Lys Phe Thr Pro Ile Gly Leu Asn Glu Val Ala Asn Gly His Arg Phe  
 385 390 395 400

Glu Gln Trp Thr Leu Pro Arg Tyr Ser Gly Ala Leu Thr Leu Asn Met  
 405 410 415

Asn Leu Ala Pro Ala Val Ala Pro Leu Phe Pro Gly Glu Arg Leu Leu  
 420 425 430

Phe Phe Arg Ser Tyr Val Pro Leu Lys Gly Gly Phe Gly Asn Pro Ala  
 435 440 445

Ile Asp Cys Ser Val Pro Gln Glu Trp Val Gln His Phe Tyr Gln Glu  
 450 455 460

Ser Ala Pro Ser Leu Gly Asp Val Ala Leu Val Arg Tyr Val Asn Pro  
 465 470 475 480

Asp Thr Gly Arg Val Leu Phe Glu Ala Lys Leu His Lys Gly Gly Phe  
 485 490 495

Leu Thr Val Ser Ser Thr Ser Thr Gly Pro Val Val Val Pro Ala Asn



500                      505                      510  
 Gly Tyr Phe Lys Phe Asp Ser Trp Val Asn Gln Phe Tyr Ser Leu Ala  
           515                      520                      525  
 Pro Met Gly Thr Gly Asn Gly Arg Arg Arg Val Gln  
           530                      535                      540  
  
 <210> 8  
 <211> 535  
 <212> PRT  
 <213> Hu/NLV/Chitta 1876/1996/JP  
  
 <400> 8  
 Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ala Pro Ser Asn Asp Gly Ala Ala  
       1                      5                      10                      15  
 Gly Leu Val Pro Glu Ala Asn Asn Glu Thr Met Ala Leu Glu Pro Val  
           20                      25                      30  
 Ala Gly Ala Ser Ile Ala Ala Pro Leu Thr Gly Gln Asn Asn Ile Ile  
           35                      40                      45  
 Asp Pro Trp Ile Arg Leu Asn Phe Val Gln Ala Pro Asn Gly Glu Phe  
           50                      55                      60  
 Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Val Leu Leu Asn Leu Glu  
           65                      70                      75                      80  
 Leu Gly Pro Glu Leu Asn Pro Tyr Leu Ala His Leu Ser Arg Met Tyr  
           85                      90                      95  
 Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Val Glu Val Gln Val Leu Leu Ala Gly Asn  
           100                      105                      110  
 Ala Phe Thr Ala Gly Lys Leu Val Phe Ala Ala Val Pro Pro His Phe  
           115                      120                      125  
 Pro Leu Glu Asn Ile Ser Pro Gly Gln Ile Thr Met Phe Pro His Val  
           130                      135                      140  
 Ile Ile Asp Val Arg Thr Leu Glu Pro Val Leu Leu Pro Leu Pro Asp  
           145                      150                      155                      160  
 Val Arg Asn Asn Phe Phe His Tyr Asn Gln Gln Asn Glu Pro Arg Met



165	170	175
Arg Leu Val Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ser Asn Gly Ser Gly		
180	185	190
Asp Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Ser Pro		
195	200	205
Asp Phe Asp Phe Asn Tyr Leu Val Pro Pro Thr Leu Glu Ser Lys Thr		
210	215	220
Lys Pro Phe Thr Leu Pro Ile Leu Thr Ile Gly Glu Leu Thr Asn Ser		
225	230	235
Arg Phe Pro Val Pro Ile Asp Glu Leu Tyr Thr Ser Pro Asn Glu Ser		
245	250	255
Leu Val Val Gln Pro Gln Asn Gly Arg Cys Ala Leu Asp Gly Glu Leu		
260	265	270
Gln Gly Thr Thr Gln Leu Leu Pro Thr Ala Ile Cys Ser Phe Arg Gly		
275	280	285
Arg Ile Asn Gln Lys Val Ser Gly Glu Asn His Val Trp Asn Met Gln		
290	295	300
Val Thr Asn Ile Asn Gly Thr Pro Phe Asp Pro Thr Gly Asp Val Pro		
305	310	315
Ala Pro Leu Gly Thr Pro Asp Phe Ser Gly Lys Leu Phe Gly Val Leu		
325	330	335
Ser Gln Arg Asp His Asp Asn Ala Cys Arg Ser His Asp Ala Val Ile		
340	345	350
Ala Thr Asn Ser Ala Lys Phe Thr Pro Lys Leu Gly Ala Ile Gln Ile		
355	360	365
Gly Thr Trp Glu Glu Asp Asp Val His Ile Asn Gln Pro Thr Lys Phe		
370	375	380
Thr Pro Val Gly Leu Phe Glu Asn Glu Gly Phe Asn Gln Trp Thr Leu		
385	390	395
Pro Asn Tyr Ser Gly Ala Leu Thr Leu Asn Met Gly Leu Ala Pro Pro		
405	410	415



Val Ala Pro Thr Phe Pro Gly Glu Gln Ile Leu Phe Phe Arg Ser His  
 420 425 430

Ile Pro Leu Lys Gly Gly Val Ala Asp Pro Val Ile Asp Cys Leu Leu  
 435 440 445

Pro Gln Glu Trp Ile Gln His Leu Tyr Gln Glu Ser Ala Pro Ser Gln  
 450 455 460

Ser Asp Val Ala Leu Ile Arg Phe Thr Asn Pro Asp Thr Gly Arg Val  
 465 470 475 480

Leu Phe Glu Ala Lys Leu His Arg Ser Gly Tyr Ile Thr Val Ala Asn  
 485 490 495

Thr Gly Ser Arg Pro Ile Val Val Pro Ala Asn Gly Tyr Phe Arg Phe  
 500 505 510

Asp Thr Trp Val Asn Gln Phe Tyr Ser Leu Ala Pro Met Gly Thr Gly  
 515 520 525

Asn Gly Arg Arg Arg Val Gln  
 530 535

<210> 9

<211> 542

<212> PRT

<213> Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP

<400> 9

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ala Pro Ser Asn Asp Gly Ala Ala  
 1 5 10 15

Ser Leu Val Pro Glu Gly Ile Asn Glu Thr Met Pro Leu Glu Pro Val  
 20 25 30

Ala Gly Ala Ser Ile Ala Ala Pro Val Ala Gly Gln Thr Asn Ile Ile  
 35 40 45

Asp Pro Trp Ile Arg Thr Asn Phe Val Gln Ala Pro Asn Gly Glu Phe  
 50 55 60

Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Ile Leu Leu Asn Leu Glu  
 65 70 75 80





Leu Gly Pro Asp Leu Asn Pro Tyr Leu Ala His Leu Ser Arg Met Tyr  
85 90 95

Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Val Glu Val Gln Val Leu Leu Ala Gly Asn  
100 105 110

Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Leu Phe Ala Ala Ile Pro Pro Asn Phe  
115 120 125

Leu Val Asp Met Ile Ser Pro Ala Gln Ile Thr Met Leu Pro His Leu  
130 135 140

Ile Val Asp Val Arg Thr Leu Glu Pro Ile Met Thr Pro Leu Pro Asp  
145 150 155 160

Val Arg Asn Val Phe Tyr His Phe Asn Asn Gln Pro Gln Pro Arg Met  
165 170 175

Arg Leu Val Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ser Asn Gly Ser Gly  
180 185 190

Asp Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Thr Pro  
195 200 205

Asp Phe Glu Phe Ile Tyr Leu Val Pro Pro Ser Val Glu Ser Lys Thr  
210 215 220

Lys Pro Phe Thr Leu Pro Ile Leu Thr Ile Ser Glu Leu Thr Asn Ser  
225 230 235 240

Arg Phe Pro Ile Pro Ile Glu Gln Leu Tyr Thr Ala Pro Asn Glu Thr  
245 250 255

Asn Val Val Gln Cys Gln Asn Gly Arg Cys Thr Leu Asp Gly Glu Leu  
260 265 270

Gln Gly Thr Thr Gln Leu Leu Ser Ser Ala Val Cys Phe Leu Gln Gly  
275 280 285

Arg Thr Val Ala Asp Asn Gly Asp Asn Trp Asp Gln Asn Leu Leu Gln  
290 295 300

Leu Thr Tyr Pro Asn Gly Ala Ser Tyr Asp Pro Thr Asp Glu Val Pro  
305 310 315 320



Ala Pro Leu Gly Thr Gln Asp Phe Ser Gly Met Leu Tyr Gly Val Leu  
325 330 335

Thr Gln Asp Asn Val Asn Val Ser Thr Gly Glu Ala Lys Asn Ala Lys  
340 345 350

Gly Ile Tyr Ile Ser Thr Thr Ser Gly Lys Phe Thr Pro Lys Ile Gly  
355 360 365

Ser Ile Gly Leu His Ser Ile Thr Glu His Val His Pro Asn Gln Gln  
370 375 380

Ser Arg Phe Thr Pro Val Gly Val Ala Val Asp Glu Asn Thr Pro Phe  
385 390 395 400

Gln Gln Trp Val Leu Pro His Tyr Ala Gly Ser Leu Ala Leu Asn Thr  
405 410 415

Asn Leu Ala Pro Ala Val Ala Pro Thr Phe Pro Gly Glu Gln Leu Leu  
420 425 430

Phe Phe Arg Ser Arg Val Pro Cys Val Gln Gly Leu Gln Gly Gln Asp  
435 440 445

Ala Phe Ile Asp Cys Leu Leu Pro Gln Glu Trp Val Asn His Phe Tyr  
450 455 460

Gln Glu Ala Ala Pro Ser Gln Ala Asp Val Ala Leu Ile Arg Tyr Val  
465 470 475 480

Asn Pro Asp Thr Gly Arg Thr Leu Phe Glu Ala Lys Leu His Arg Ser  
485 490 495

Gly Phe Ile Thr Val Ser His Thr Gly Ala Tyr Pro Leu Val Val Pro  
500 505 510

Pro Asn Gly His Phe Arg Phe Asp Ser Trp Val Asn Gln Phe Tyr Ser  
515 520 525

Leu Ala Pro Met Gly Thr Gly Asn Gly Arg Arg Arg Ile Gln  
530 535 540

<210> 10  
<211> 550  
<212> PRT



&lt;213&gt; Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP

&lt;400&gt; 10

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ala Pro Ser Asn Asp Gly Ala Ala  
 1 5 10 15

Asn Leu Val Pro Glu Ala Asn Asp Glu Val Met Ala Leu Glu Pro Val  
 20 25 30

Val Gly Ala Ser Ile Ala Ala Pro Val Val Gly Gln Gln Asn Ile Ile  
 35 40 45

Asp Pro Trp Ile Arg Glu Asn Phe Val Gln Ala Pro Gln Gly Glu Phe  
 50 55 60

Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Met Leu Leu Asn Leu Glu  
 65 70 75 80

Leu Gly Pro Glu Leu Asn Pro Tyr Leu Ser His Leu Ser Arg Met Tyr  
 85 90 95

Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Met Gln Val Gln Val Val Leu Ala Gly Asn  
 100 105 110

Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Phe Ala Ala Val Pro Pro His Phe  
 115 120 125

Pro Val Glu Asn Ile Ser Ala Ala Gln Ile Thr Met Cys Pro His Val  
 130 135 140

Ile Val Asp Val Arg Gln Leu Glu Pro Val Leu Leu Pro Leu Pro Asp  
 145 150 155 160

Ile Arg Asn Arg Phe Phe His Tyr Asn Gln Glu Asn Thr Pro Arg Met  
 165 170 175

Arg Leu Val Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ala Asn Ser Gly Glu  
 180 185 190

Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Ala Pro Asp  
 195 200 205

Phe Glu Phe Thr Phe Leu Val Pro Pro Thr Val Glu Ser Lys Thr Lys  
 210 215 220

Pro Phe Thr Leu Pro Ile Leu Thr Leu Gly Glu Leu Ser Asn Ser Arg



225		230		235		240									
Phe	Pro	Ala	Ala	Ile	Asp	Met	Leu	Tyr	Thr	Asp	Pro	Asn	Glu	Ser	Ile
				245					250					255	
Val	Val	Gln	Pro	Gln	Asn	Gly	Arg	Cys	Thr	Leu	Asp	Gly	Thr	Leu	Gln
			260					265					270		
Gly	Thr	Thr	Gln	Leu	Val	Pro	Thr	Gln	Ile	Cys	Ala	Phe	Arg	Gly	Thr
		275					280					285			
Leu	Ile	Ser	Gln	Thr	Ala	Arg	Ala	Ala	Asp	Ser	Thr	Asp	Ser	Pro	Gln
	290					295					300				
Arg	Ala	Arg	Asn	His	Pro	Leu	His	Val	Gln	Val	Lys	Asn	Leu	Asp	Gly
305					310					315				320	
Thr	Gln	Tyr	Asp	Pro	Thr	Asp	Asp	Ile	Pro	Ala	Val	Leu	Gly	Ala	Ile
				325					330					335	
Asp	Phe	Lys	Gly	Thr	Val	Phe	Gly	Val	Ala	Ser	Gln	Arg	Asp	Val	Ser
			340					345					350		
Gly	Gln	Gln	Glu	Gln	Gly	His	Tyr	Ala	Thr	Arg	Ala	His	Glu	Ala	His
		355					360					365			
Ile	Asp	Thr	Thr	Asp	Pro	Lys	Tyr	Ala	Pro	Lys	Leu	Gly	Thr	Ile	Leu
	370					375					380				
Ile	Lys	Ser	Gly	Ser	Asp	Asp	Phe	Asn	Thr	Asn	Gln	Pro	Ile	Arg	Phe
385					390					395				400	
Thr	Pro	Val	Gly	Met	Gly	Asp	Asn	Asn	Trp	Arg	Gln	Trp	Glu	Leu	Pro
				405					410				415		
Asp	Tyr	Ser	Gly	Arg	Leu	Thr	Leu	Asn	Met	Asn	Leu	Ala	Pro	Ala	Val
			420					425				430			
Ser	Pro	Ser	Phe	Pro	Gly	Glu	Arg	Ile	Leu	Phe	Phe	Arg	Ser	Ile	Val
		435					440				445				
Pro	Ser	Ala	Gly	Gly	Tyr	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ile	Asp	Cys	Leu	Ile	Pro
	450					455				460					
Gln	Glu	Trp	Val	Gln	His	Phe	Tyr	Gln	Glu	Ala	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser
465				470					475					480	





Ala Val Ala Leu Val Arg Tyr Val Asn Pro Asp Thr Gly Arg Asn Ile  
                   485                  490                  495

Phe Glu Ala Lys Leu His Arg Glu Gly Phe Leu Thr Val Ala Asn Cys  
                   500                  505                  510

Gly Asn Asn Pro Ile Val Val Pro Pro Asn Gly Tyr Phe Arg Phe Glu  
                   515                  520                  525

Ala Trp Gly Asn Gln Phe Tyr Thr Leu Ala Pro Met Gly Ser Gly Gln  
                   530                  535                  540

Gly Arg Arg Arg Ala Gln  
 545                  550

<210> 11

<211> 541

<212> PRT

<213> Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP

<400> 11

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ala Pro Ser Ser Asp Gly Ala Ala  
   1                  5                  10                  15

Gly Leu Val Pro Glu Ile Asn Asn Glu Val Met Pro Leu Glu Pro Val  
                   20                  25                  30

Ala Gly Ala Ser Leu Ala Thr Pro Val Val Gly Gln Gln Asn Ile Ile  
                   35                  40                  45

Asp Pro Trp Ile Arg Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro Ala Gly Glu Phe  
                   50                  55                  60

Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Ile Leu Leu Asp Leu Glu  
   65                  70                  75                  80

Leu Gly Pro Asp Leu Asn Pro Tyr Leu Ala His Leu Ala Arg Met Tyr  
                   85                  90                  95

Asn Gly His Ala Gly Gly Met Glu Val Gln Ile Val Leu Ala Gly Asn  
                   100                  105                  110

Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Phe Ala Ala Ile Pro Pro Gly Phe  
                   115                  120                  125



Pro Tyr Glu Asn Leu Ser Pro Ser Gln Ile Thr Met Cys Pro His Val  
 130 135 140  
 Ile Ile Asp Val Arg Gln Leu Glu Pro Phe Leu Leu Pro Met Pro Asp  
 145 150 155 160  
 Ile Trp Asn Asn Phe Phe His Tyr Asn Gln Gly Asn Asp Pro Lys Leu  
 165 170 175  
 Arg Leu Val Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ala Asn Asn Ser Gly  
 180 185 190  
 Asp Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Lys Pro Ser Pro  
 195 200 205  
 Asp Phe Glu Phe Thr Phe Leu Val Pro Pro Thr Val Glu Ser Lys Thr  
 210 215 220  
 Lys Gln Phe Ala Leu Pro Ile Leu Lys Ile Ser Glu Met Thr Asn Ser  
 225 230 235 240  
 Arg Phe Pro Val Pro Val Asp Val Met Tyr Thr Ala Arg Asn Glu Asn  
 245 250 255  
 Gln Val Val Gln Pro Gln Asn Gly Arg Val Thr Leu Asp Gly Glu Leu  
 260 265 270  
 Leu Gly Thr Thr Pro Leu Leu Ala Val Asn Ile Cys Lys Phe Lys Gly  
 275 280 285  
 Glu Val Ile Ala Lys Asn Gly Asp Val Arg Ser Tyr Arg Met Asp Met  
 290 295 300  
 Glu Ile Thr Asn Thr Asp Gly Thr Pro Ile Asp Pro Thr Glu Asp Thr  
 305 310 315 320  
 Pro Gly Pro Ile Gly Ser Pro Asp Phe Gln Gly Ile Leu Phe Gly Val  
 325 330 335  
 Ala Ser Gln Arg Asn Lys Asn Glu Gln Asn Pro Ala Thr Arg Ala His  
 340 345 350  
 Glu Ala Ile Ile Asn Thr Gly Gly Asp His Leu Cys Pro Gln Ile Ser  
 355 360 365



Ser Ser Glu Ile Tyr Leu Thr Ser Pro Asn Ile Leu Arg Cys Thr Asn  
 370 375 380

Pro Gln Pro Leu Pro Gln Ser Gly Leu Arg Gly Thr Ile Leu Ile Arg  
 385 390 395 400

Ser Asp Asn Gly His Cys His Asp Met Val Gly Thr Ser Pro Thr Thr  
 405 410 415

Pro Thr Trp Pro Gln Gln Trp Arg Arg Cys Ser Arg Gly Ser Asn Cys  
 420 425 430

Cys Ser Ser Gly His Arg Tyr Pro Val Pro Val Val Met Asn Arg Val  
 435 440 445

Thr Trp Ile Val Leu Ser His Lys Ser Gly Phe Ser Thr Ser Thr Arg  
 450 455 460

Lys Leu Pro Gln Leu Asn Leu Arg Trp Pro Leu Ile Arg Phe Ile Asn  
 465 470 475 480

Pro Asp Thr Gly Arg Val Leu Phe Glu Ala Arg Leu His Lys Gln Gly  
 485 490 495

Phe Ile Thr Val Ala His Thr Gly Asp Asn Pro Ile Val Met Pro Pro  
 500 505 510

Asn Gly Tyr Phe Arg Phe Glu Ala Trp Val Asn Gln Phe Tyr Ser Leu  
 515 520 525

Ala Pro Val Gly Thr Gly Lys Gly Arg Arg Arg Val Gln  
 530 535 540

<210> 12

<211> 1638

<212> DNA

<213> Hu/NLV/Kashiwa 645/1999/JP

<400> 12

atgatgatgg cgtctaagga cgccccaaca aacatggatg gcaccagtgg tgccggccag 60  
 ctgttaccag aggcaaatac agctgagcct atatcaatgg agcctgtggc tggggcagca 120  
 acagctgccg caaccgtgg ccaagttaat atgattgacc cctggataat gaataattat 180  
 gtgcaagccc ctcaaggta attaccata tcgcctaata acacaccagg tgatattttg 240  
 ttgatctac aattaggccc tcatctcaat cctttcttat cccatttggc ccaaattgat 300  
 aacggittggg ttggcaatat gaaagigaag gtcctattgg ctggtaatgc cttcacggct 360



ggtaaaataa tcattagttg cataccccct ggctttgctg cgcaaaacat ttctatcgct 420  
 caggccacaa tgttccccca cgttatagct galgttaggg ttttggaaacc tattgagggtg 480  
 ccattggaag atgtgaggaa tgtgctgttc cataacaatg acaacgcacc aaccatgagg 540  
 ttgggtgtgca tgcctacac ccccttgca gccagtggtg gctcatctgg aactgacct 600  
 tttgtgattg ctgggcgtgt tctgacatgc ccaagccctg actttagctt cttattcttg 660  
 gtcccccca atgtagagca aaagactaaa ctttttagtg tcccaaatct tccactgaat 720  
 acccttcaa attcaagagt ccttctcta attaaatcaa tgaigtatc cagagaccat 780  
 gggcagatgg ttcagtcca aaacggtagg gtcaccctgg atgggcaact gcaaggcacc 840  
 acgcccacat cagctagcca gctgtgcaaa atcagaggca gtgtcttcca tgcataatgt 900  
 gggaatggat ataacctaac tgaattggat gggagcccat accatgctt tgagagccct 960  
 gcgccaatag ggtttccga tctaggtaga tgtgattggc acatggaggc cccccctacc 1020  
 acccaattca atactgggtg tttataaaa caaatatg tcaaacaaga atcagcttt 1080  
 gctccccacc ttgttaccat acaagcagat ggcttgatg atgtgagtgt caacactaac 1140  
 atgatagcca aattgggatg ggtgtcacc gtcagtatg gacatagagg agatgtcat 1200  
 ccgigggtca tccacgata tgggtcgact ttgaccgagg ccgccaatt agcccccca 1260  
 atatatcccc caggitttgg tgaggccatt gtgttttca tgcagattt tctatagcc 1320  
 catgttacca atggcttgag tggccttgc accatacccc aagaatttgt caccatttt 1380  
 gtcaatgaac agggccctac tagaggggaa gcagccctac tgcattatt agaccctgat 1440  
 accatagaa atcttgggtg gtttaaatg taccctgagg ggttcatgac gtgtgtgct 1500  
 aattccagtg gcacttggtc aaaaaccc ccaatcaatg gtgttttgt tttgtgtcc 1560  
 tgggtttcca gattctatca gttaaagcti gtgggaacag ccggcccgcc ttttaggctt 1620  
 ggcatcagaa gatcataa 1638

<210> 13

<211> 1593

<212> DNA

<213> Hu/NLV/Seto 124/1989/JP

<400> 13

atgatgatgg cgtctaagga cgctacgtca agcgtggatg gcgccagtgg cgctggctcag 60  
 ttgtaccgg aggttaatgc ttctgaccti ctgtcaatgg atcctgtggc gggttcttca 120  
 acagcagttg caactgcagg gcaagttaac cctattgacc ctgttgataat caataacttt 180  
 gtgcaggctc cccaagggtg atttactatt tctccaaata atacccccgg ttgtgttttg 240  
 ttgtatttga gtctaggccc tcatcttaat ccttcttgt tacattgtc acaaatgtat 300  
 aatggctggg ttggcaacat gagagttagg attatgtgg ctggtaatgc atttactgca 360  
 ggcaaaattg tagtttcttg catacctcct ggctttggct cccataatct tactatagca 420  
 caagcaactc tcttcccgca tgtattgtc gatgttagga cttagaccc aattgaagta 480  
 cctttggaag atgtaaggaa tgttctcttt cataataatg atagaaatca acaaacatg 540  
 cgccttgtgt gtatgcttta tccccctc cgacttggtg gcggtacagg tgattcttt 600  
 gtgtgttcag ggcgagtcac gacttgcct agccccgatt tcaatttctt gttcttgggt 660  
 cctcccacag tgaacagaa gactaggcct ttcacctcc caaatttacc gctgagttct 720  
 ttgtcaaatc cagtgctcc tcttcaatt agtggcatgg gtatttctcc agacaatgtt 780  
 cagagtgtgc agtttcaaaa tggccgatgt acccttagacg ggcttctgt ttgtaccacc 840  
 ccagtttccc tctcccacgt tgcataagaa aggggcacti ctaatggtac tggatcaat 900  
 ctaccgaat tggatggcac ccttctccac cttttgaag gccctgcccc tattggtttt 960





```

ccagatcttg gtggctlga ttggcatatt aatatgacac aattlgggca ttccagtcag 1020
acicaataig atgtagatac ccccccgac acctlctcc ctacttagg ticaatccag 1080
gcgaatggca ttggtagtag caactatatt ggtgttctta gctgggtctc cccccatca 1140
catccatctg gctctcaagi tgatctcigg aagatcccca actatgggtc tagcatcaca 1200
gaggcaaccc atctagctcc ctctgctat cctcciggct ttggagaggt gtagtcttt 1260
ttcatgtcaa agataacctg tcttgggtct tatagctgc cctgtttact gccacaagaa 1320
tatactcac acctcgcaag tgaacaagcc cccactgttg gtgaggccgc ctgtctccac 1380
tatgttgacc ctgacacggg cgggactctt ggggagtta aggcttacc tgatggttc 1440
ctaacctgtg tccctaacgg ggccagctcg ggcccacaac aactaccaat caatggagtc 1500
tttgtcttg tticatgggt giccagattt tatcagttaa agcctgtggg aactgccagt 1560
tcggcaagag gtaggccttg ttgcgccga taa 1593

```

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 1641

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Hu/NLV/Funabashi 258/1996/JP

&lt;400&gt; 14

```

atgatgatgg cgictaagga cgccccctcaa agcgctgatg gcgcaagcgg cgcaggctcaa 60
ctggctccgg aggttaatac agctgacccc ttacccaatgg aaccctgggc tgggccaaca 120
acagccgtag ccacigctgg gcaagttaat atgatgatc cctggattgt taataatttt 180
gtccagtcac cacaaggtag gtttacaatt tcccctaata atacccccgg tgatattttg 240
tttgatttac aatagggtcc acatctaaac ctttcttgi cacatctgc ccaaagtat 300
aatggctggg ttgaaacat gagagttagg attctccttg ctgggaatgc attctcagct 360
ggaaagatta tagtttgtg tgtccccctt ggctttacat ctctctctc caccatagct 420
caggctacat tgttcccca tgtgattgt gatgtgagaa ccttgaacc aatagaaatg 480
ccccctgagg atgtacgcaa tgtctctat cacaccaatg ataataacc aacaatgcgg 540
ttggtgtgta tgcgtacac gccgtccgc actgggtggg ggtctggtaa ttctgattct 600
tttgtgttg ctggcagggt gctcacggcc cctagtagcg acttcagttt ctgttctt 660
gtcccgcta ccatagaaca gaagactcgg gcttttactg tgcctaatai ccccttgcaa 720
acctgtcca attctaggtt tcttccctc atccaggga tgattctgtc tctgacgca 780
tcicaagtgg tccaattcca aaatggacgt tgcctcatag atggtaact cctaggcact 840
acaccgcta catcaggaca gctgttcaga glaagaggaa agataaatca gggagcccgt 900
acgtcaacc tcacagaggt ggalggcaaa ccatlcatgg catttgattc cctgcacct 960
gtgggttcc cggattttgg aaaatgtgat tggcatatga gaatcagcaa aaccccaat 1020
aacacaagct caggtagacc catgcgcagt gtcagcgtgc aaaccaatgt gcagggttt 1080
gtccacacc taggaagtat acagttgat gaagtgtca accacccac aggtgactac 1140
attggcacca ttgaatggt ttcccagcca tctacacccc ctggaacaga tattaatctg 1200
tgggagattc cggattatgg atcatccctt tccaagcag ctaatctggc cccccagta 1260
ttccccctg gatttggta ggtcttgtg tactttgtt ctgttttcc aggcccac 1320
aaccgctcag cccgaatga tgtacctgt ctctccctc aagagtacat aaccacttt 1380
gtcagtgaac aagcccaac gatgggtgac gcagcttgc tgcattatgt cgacctgat 1440
accaacagaa accttgggga gttaagcta taccctggag gtlacctcac ctgtgtacca 1500
aacgggttgg gtgccgggcc tcaacagctt cctctaatg gtgttttct cttgtctct 1560
tgggtgtctc gttttatca gctcaagcct gtgggaacag ccagtacggc aagaagtagg 1620

```



cttggagatgc gccgtatata a

1641

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 1635

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Hu/NLV/Chiba 407/1987/JP

&lt;400&gt; 15

```

atgatgatgg cgtciaagga cgctacacca agcgcagatg gcgccactgg cgccggccag 60
ctggtaaccgg aggttaatac agctgacccc atacctatig accctgtggc tggctccctc 120
acagcccttg ccacagcagg ccaggtaaat ttgattgaic cctggataat caataatatt 180
gtgcaagccc cccaggcgga gticacaata tccccaaata atacccccgg tgatgtgctt 240
tttgatttgc aatlaggacc ccatttaaat cttttccitt cccacctttc tcagatgtat 300
aatggttggg tgggaacat gcgagtgctg gtgtgtctgg ctggtaatgc ttacacggct 360
gggaagggtt taatttgttg tgcctccctt gggttccaat ctgcaccctt ttctatagcc 420
caggctactt tatttcccca tgaattgtct gatgttagga ccttgaccc tglagaagtg 480
ccccctgaag atgttaggaa tgtgttgtat cataataatg acaccaacc caccatgcgc 540
ctcctttgca tgtgtacac tccctccgc accgggggag cgtctgggtg gactgattct 600
tttgtgtggg ctggcggtgt acacactgtt ccgggcccctg acttaactt cttattccca 660
gtccctccca cagtcgagca aaagaccgcg ccttttactg tgcctaatai ccttttgaag 720
tacctgtcta attccaggat cccaaatcct attgaaggta tgtcattgtc acctgaccag 780
acccaaaatg ttcaattcca gaatggtagg tgtacaatg acgttcaacc ccttgggacc 840
acacctgtct cagttagta gtatgtgaag ttiaggggta ggattacatc tggacagaga 900
gtgtcaacti tgacagagti ggatgggtca ccttttatgg ccttggccgc ccccgccctt 960
gcgggtcttc cagatcttgg gtctgtgtat tggcatatig aaatgagtaa aatcccaaat 1020
tccagacccc agaacaacc aatagtgacc aattctgtca aaccaatag tcaacagtti 1080
gtccacacti tltcaagtai cacccttgat gaaaatgttt ccagtgaggg tgactatatt 1140
ggcactatac aatggaccic acciccttcti gattctggcg gggccaatac aaatttttgg 1200
aaaatcccig actatgggtc cagcctagca gaagcttcac aactggcccc cgtgtctat 1260
ccacctgggt tcaatgaggt gatttgttat ttatggcat ctatacctgg tcccaatcag 1320
tctgggtctc ctaatttagt gccatgcctg ctccccagg aatatataac acactttatt 1380
agttagcagg ccccatcca ggttaggcti gccctactcc actatgtaga cccagacacc 1440
aatcgcaatt tgggtgagti caaatatata cctgtgtgtt atttaacctg tgttccaat 1500
agtcttagta ctggacctca acaacttctt cttgatgggt tatttgtctt tgcctcttgg 1560
gtttctagat ttatcaatt aaagcctgtg ggaacagccg gaccggctag aggtaggctt 1620
ggtgtccgta gataa 1635

```

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 1620

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Hu/NLV/Narita 104/1997/JP

&lt;400&gt; 16

atgaagatgg cgtcgaatga cgccaaccca tctgatgggt ccacagccaa cctcgtccca 60



gaggtcaaca atgaggitat ggcttggag cccgttgttg gtgccgctat tgcggcacct 120  
 gtagcgggcc aacaaaatgt aatigacccc tggattagaa ataattttgt acaagcccc 180  
 ggtggagagt ttacagiatc ccctagaaac gctccgggtg agatattatg gagcgcgccc 240  
 ttgggccctg atttgaaccc ctacctttct catttggcca gaatgtacaa tggltatgca 300  
 ggtggttttg aagtgcaggt aatccctcgc gggaacgcgt tcaccgccgg gaaaatcata 360  
 ttigcagcag tcccacaaaa ttttccaact gaagccttga gccccagcca ggttactatg 420  
 tcccccaata taatagtaga tgttaggcaa ttggaacctg tatgatccc cttaacctgat 480  
 gtttaggaata acttctatca ttacaatcaa tcaaatgatt ctaccattaa attgatagca 540  
 atgctgtata caccacttag ggctaataat gctggggatg atgtcttcac agtctcttgt 600  
 cgagtcctca cgaggccatc ccccgatttt gatttcataat tcttggtgcc acccacagtt 660  
 gaatcaagaa ctaaaccatt caccgtccca atcttaactg ttgaggaaat gtctaactca 720  
 agattcccca ttccittgga aaagttgtac acgggtccca gcagtgcttt tgtgttccaa 780  
 ccacaaaatg gcagggtcac gactgatggc gtgtcttag gcactacca gctgtctgct 840  
 gtaacatcti gcaccttcag aggggatgtc acccacattg caggcagica tgactatata 900  
 atgaatttgg ctcttcaaaa ttggagcaat tatgacccaa cagaagaaat cccagcccc 960  
 ctgggaactc cagatttcgt gggaagatc caaggcatgc tcacccaaac cacaagagag 1020  
 gatggctcga cccgcgcccc caaagctaca gtgagcactg ggagtgtcca ctctactcca 1080  
 aagctgggca gtgttcaala caccactgac acaacaatg attttcaaac tggccaaaac 1140  
 acgaaatca cccagtcgg cgctatccag gacggtaata atcatcaaaa tgaaccccaa 1200  
 caatgggtgc tcccaaatta ctacagtaga actggtcata atgtgcacct agctcctgcc 1260  
 gtgtccccc ctttccggg tgagcaactt cttttcttta ggtccactat gcccggatgt 1320  
 agcgggtatc ctaacatgaa tctggattgc ctactcccc aggaatgggt gcaacacttc 1380  
 tgccaagaag cagctccagc acaatctgat gtggctctgc tgagatttgt gaatccagac 1440  
 acaggtaggg ttttgtttga gtgcaagtc cataaatcag gctatgtcac agtgggtcac 1500  
 actggccgcg atgatttgg tttcccccc aatggttact ttagatttga ctcttgggtc 1560  
 aaccagtict acacacttgc ccccatggga aatggagcgg ggccgaggcg tgcattataa 1620

<210> 17

<211> 1647

<212> DNA

<213> Hu/NLV/Sanbu 809/1998/JP

<400> 17

atgaagatgg cgtcgaatga cgtgtctcca tctaattgat gtgccgccgg cctcgtccca 60  
 gagatcaaca atgaggcaat ggcgctagac ccagtggcgg gtgcagcgt agcagcggcc 120  
 ctctactggc agcaaaacat aatgatccc tggattatga ataattttgt gcaagcacct 180  
 ggtgtgaggt ttacagtgtc ccctaggaat tcccctgggt aagtgttct taatttggaa 240  
 ttgggccccag aaataaaccc ttatttggcc catcttgcta gaatgtataa tggttatgca 300  
 ggttgatttg aagtgcaggt ggtcctggct gggaatgcgt tcacagcagg aaagataatc 360  
 ttigcagcta tcccccttaa ttttccaatt gataatctga gcgcagcaca aatcactatg 420  
 tggccgatg tgatttgtga tgtcagacag ttggaaccgg tcaaccttcc gatgcctgac 480  
 gttcgcaaca atttctttca ttacaatcaa ggtcttgatt cgcgattgct cttaattgca 540  
 atgctgtata cactcttag ggcaataat tctggagatg atgttttcac tgtgtcttgt 600  
 agagtaciga ctaggcctag ccttgatttt tcatccaatt tcttgtccc acccacgtg 660  
 gaatcaaga caaaacccct taccctccct attctgacta tctctgaaat gtccaattct 720



aggtttccag tgccgattga gtctttgcac accagcccaa ctgagaatat tgttgtccag 780  
 tgccaaaatg ggcgcgtcac tctcgatggt gagttgatgg gcaccacca acitctaccg 840  
 agtcaaattt gigtcttttag gggcgtgctc accagatcaa caagcagggc cagtgaicag 900  
 gccgatacag caacccttag gctgtttaat tattattggc atgtacaatt ggataatcta 960  
 aatgggaccc cttatgatcc tgcagaagac ataccaggcc ccctaggac accagacttc 1020  
 cggggcaagg tctttggcgt ggccagccag agaaaccctg acagcacaac tagagcat 1080  
 gaagcaaaag tggacacaac agctggctgt ttcaccccaa agttgggctc attagaaata 1140  
 tctactgatt ccgatgactt tgaccaaaac cagccaacaa agttcacccc agttggcatt 1200  
 ggggttgaca atgaggcaga atttcagcaa tggctcttac ccgactattc tggtcagttc 1260  
 acccacaaca tgaacctggc cccagctgtt gctcccaact tccctgggtg gcagctcctt 1320  
 ttcttccgt cacagttacc atcttctgtt gggcgatcca acggggctct agactgtctg 1380  
 gtccccagg aatgggtcca acacttctac caggaatcgg cccccgcca aacacaagt 1440  
 gccctggita ggtatgtcaa ccctgacact ggtaaagtc tatttgaggc caagctgcat 1500  
 aaattagggt ttatgactat agctaacaat ggtgattctc caataactgt tcccccaat 1560  
 ggatatttta gggttgaatc ttgggtgaac cctttttata cacttgcccc catgggaact 1620  
 gggaacgggc glagaaggat tcaataa 1647

<210> 18

<211> 1623

<212> DNA

<213> Hu/NLV/Ichikawa 754/1998/JP

<400> 18

atgaagatgg cgtcgaatga cgctactcca tctaataatg gtgccgccgg cctcgtgcc 60  
 gaaagtaaca atgaggcaat ggctctggaa cccgtgggtg gggcgtcttt agccgcccc 120  
 gtcactggcc aaactaatat aatagacccc tggattagaa ctaattttgt ccaagcccc 180  
 aatggigaat ttacagtctc ccctagaaat tccccggag agatattggt caatttggag 240  
 ttgggtccag aactgaacct ttatctggca catttagcta ggaigtacaa tggttatgcg 300  
 ggtgglatgg aggtgcaagt gatgctcgcg gggaacgcgt tcaactgctg caagatcatc 360  
 ttgtccgccg tgcacccta ctttccagtg gaaaatctta gcccttccca aataacaatg 420  
 tttccacatg tgatcatcga tgtcagaacc ttggaacctg tattactccc aatgcctgat 480  
 gtcagaagca cccctttcca ctttaatcaa aaagatgagc ctaagatgag acttgttgcc 540  
 atgcttlaca ccccccttcg ttctaattgt tctgggtgacg acgttttcac cgtctcatgt 600  
 aggalcctca ctaggccctc cctgaattt gatattacat atttgggtgcc accaacagta 660  
 gaatcaaaga ctaagccatt cacactacct gtgctgacac tgggagaact gtccaactct 720  
 agattcccct tctctattga tgaatggct accagcccaa atgaglcct agttgttcag 780  
 ccacagaatg gtagggctac actagatggg gagctgttag gcacaacca actgcaagca 840  
 tgcaacattt gctccataag gggaaggta acagggcagg tccctagtga acaacacatg 900  
 tggaaacctg agatcacaaa cctaaatggg acgcaattg accctacaga tgatgtccca 960  
 gcccccttg gtgtgccga ctttgcaggt gaggtctttg gtgtactcag ccagagaaat 1020  
 agaggtagaa gcaaccagc aaacagggct catgacgtg tctgtgctac ctacagtgc 1080  
 aagtacaccc ctaaactagg cttagtgc aaattggaactt ggaacaccaa tgatgttgaa 1140  
 aaccagccaa caaaattcac cccaattggt ttgaatgagg tgcctaagg ccatcgattt 1200  
 gaacagtggc ctttgcctag gtattctgtt gccctgacat taaatatgaa tttagccct 1260  
 gctgtggccc cgtcttttc tggagagcgt ctccttttct tccgtctta tgtccatta 1320





aaaggiggat ttggaaaccc tgctatagat tgttcggigc ctcaggagig ggtccaacat 1380  
 ttctatcagg aatctgcccc ttctctgggg gatgtggcct tagttaggta cgtcaaccca 1440  
 gacaccgggc gcgtcccttt cgaggccaaa ctccacaaag gtgggticct gactgtgtct 1500  
 agtactagca cagggccctg tgtgggtcca gccaatggct atttcaaatt tgattccctg 1560  
 gttaatcaat ttactctct tgcceccatg ggaactggaa atgggcgtag aagggttcag 1620  
 taa 1623

<210> 19

<211> 1608

<212> DNA

<213> Hu/NLV/Chitta 1876/1996/JP

<400> 19

atgaagatgg cgtcgaatga cgccgctcca tctaataatg gtgcagccgg tcttgiacca 60  
 gaggctaaca atgagaccat ggcacttgaa ccggtggcct gggcttcaat agccgcccc 120  
 ctaccggcc aaaacaatat tatagacccc tggattagat taaattttgt gcaggctccc 180  
 aatggagagt tcacggtttc acccgcgaac tcaccgggg aagtcctatt aaatttggaa 240  
 ttaggccccg aactaaatcc atacctagca cacccttcta gaatgtataa tggttatgca 300  
 ggtggggttg aggtgcaagt actactggct gggaatgcgt tcacagctgg aaaattggig 360  
 ttigccgcag tccccctca tttccattt gaaaacataa gccctggta gataactatg 420  
 tttctcatg taattattga tgttaggact ttagaaccag tttgttgcc cttctctgat 480  
 gtttaggaata atttcttca ttataatcag cagaatgaac cgaggatgag actcgtagca 540  
 atgctttata ctctcttag atctaattgt tctggtgatg atgtatttac tgtctccigc 600  
 aggggtctta cccgacctt cctgatttt gattttaatt acttggctcc cctaccctt 660  
 gaatctaaaa ctaaacctt cacacacctt atcttgacta taggggagtt aaccaactcc 720  
 aggttccctg tgcccataga tgagctctac accagcccc atgagagctt ggtggtgcaa 780  
 cccagaacg ggagatgcgc gctagatggg gagctacagg gcacgactca gctcctccc 840  
 acggcgattt gctcgttcag gggccggatc aatcaaaaagg tgagtggaga aaacctgtt 900  
 tggaaatgc aggtcaccaa catcaacggg acccctttt atccaacagg ggaatgtccc 960  
 gctcctctag gaacccaga ttctcttgcc aagctcttt gtgtactaag ccagagagac 1020  
 catgataatg cctgtaggag tcatgatgca gtaattgcaa ccaactctgc caaattcact 1080  
 ccaaaattgg gcgctatata aattggcaca tgggaagaag acgatgtgca catcaacaa 1140  
 cctactaagt ttactccagt tggcttggtt gaaaatgaag gtttcaacca gtggacactc 1200  
 cccaattatt ctggagcctt aacacttaat atggggttgg cccctccctg gggccccacc 1260  
 ttccctggig aacaaattct ttcttttaga tcccacattc ctcttaaagg aggtgtggcg 1320  
 gaccagtta ttgattgtct ctgcctcaa gattggatcc aacatcttta ccaagagtcg 1380  
 gccccttcac aatcagatgt agcatgtatt aggtttacaa atccagacac aggacgtgtt 1440  
 ctatttgaag caaaattaca caggagtgtt tacattacag tggccaatac tggtagcaga 1500  
 ccgattgtgg taccagctaa tggttacttc aggtttgata ctgggttcaa tcaattctat 1560  
 tctctgccc catgggaac tggaaatggg cgtagaaggg ttcagtaa 1608

<210> 20

<211> 1629

<212> DNA



&lt;213&gt; Hu/NLV/Kashiwa 47/1997/JP

&lt;400&gt; 20

```

atgaagatgg cgtcgaatga cgccgctcca tcaaatgatg gtgcagctag tctcgtacca 60
gagggcatta atgagactat gccattggaa cccgttgctg gcgcacttat tgcgtcccca 120
gtggcgggac aaaccaacat aattgacccc tggataagaa caaattttgt acaagccccc 180
aatggagagt ttacagtgtc accaagaaat tcccctggag aaattttatt aaatttagaa 240
ttaggaccag atctgaatcc ttatttggcc catctttcaa gaatgtacaa tggttatgct 300
ggaggigtgt aggigcaagt gctccttgct gggaacgcgt tcacagcagg taagatatgt 360
tttgacgcaa tcccacctaa ctttctcgtg gatattgatta gccacgtca aattactatg 420
cttccccatt tgattgtaga tgttaggact ttggaacctt ttatgacacc cttgcctgat 480
gttaggaatg tgttctatca ttttaataat caacctcaac ctagaatgag gttagtggct 540
atgctctaca cccattgag gctaatggt tcaggagatg atgtcttcac tgtgtcttgt 600
agagtactaa ctaggccaac tcttgatttt gaattttatt acctgggtgcc ccttctgtga 660
gagtcacaaa cttaaccatt cacactacca atattaacca tttctgaatt gaccaactcc 720
cggttcccca tccaatcga gcaattgtat acggctccaa atgaaaccaa tgttgtccag 780
tgtcagaatg gcagggtcac cttagatgga gagctccagg gcacaacca gctgttatca 840
agtgacgttt gcttcttaca gggcaggact gtggctgata atggggataa ttgggaccaa 900
aatitgctcc agctgacctt tccaaatggt gcaagctatg accccactga tgaagtgcc 960
gcaccattgg gcactcagga ttttagtggg atgttgtatg gagtgttgac ccaggacaat 1020
gtgaatgtga gcacaggaga ggccaaaaat gctaaggga tatacatac caccactagt 1080
ggaaaattca ccccaaaaat tgggtcaatt ggattgcatt caataactga gcatgtgcac 1140
cccaaccaac agtcgcggtt caccctcgtc ggagtcgccc tggatgagaa caccctctc 1200
cagcaatggg ttctgccaca ttatgcaggt agtctcgtc tcaacaccaa ttggcacct 1260
gctgttgccc cgactttccc tggtagcaa ttgctgttct tcaggctccc tgtcccatgt 1320
gttcaaggcc tacagggaca ggaatgcgtt atagattgcc tccgccccca agagtgggtg 1380
aatcattttt accaagaggc agccctctcc caagcagacg ttgcccttat taggtatgtc 1440
aaccctgata ccggtcgcac gctgtttgaa gccaaatgc atagatcagg ttttattact 1500
gtgtcacata ctgggtgcta cctcttgtta gtcccccaa atggctcatt caggtttgat 1560
tcttgggtta atcaatttta ctacatgcc ccaatggga ctggcaatgg gcgtagaaga 1620
attcagtaa                                     1629

```

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 1653

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Hu/NLV/Mie 7k/1994/JP

&lt;400&gt; 21

```

atgaagatgg cgtcgaatga cgtcgtcca tcgaatgatg gtgctgcaa cctcgtacca 60
gaggccaacg atgaggttat ggcacttgaa cccgttggtg gagcctcaat tgcagctcct 120
gttgtcgccc agcaaaatat aattgacccc tggattagag aaaattttgt ccaagcacca 180
caaggtagat tcactgtttc accaaggaat tcgcttgccg agatgcctt aaaccttag 240
ttgggcccag aacttaatcc ctatttaagt catitgtccc gcatgtacaa cggatatgct 300
ggtggcatgc aggttcaggt ggtcctagct gggaatgcgt tcacagctgg gaaaatcctc 360
tttggccccc tgcaccaca tttccctgta gaaaacatca gtgcagccca aataactatg 420

```



```

tgccccatg tgattgttga tgtgagacaa cttgaaccag tgcttctgcc cctccctgat 480
ataaggaata ggttcttcca ciacaaccag gagaacaccc cccggaatgag gcttglagcc 540
atgctctata cactctaaag ggctaactct ggtgaggatg tattactgti gtccitgagg 600
gttcigactc gccccgcccc agattitgag ttacatitit tagttccacc aactgttgaa 660
tcaaaaacaa aaccctttac tttaacctat ttgactcttg gcgagttgtc taattctcgc 720
tttccggctg ctatagatat gctttatact gacctaatg aatcaatagt tglacaaccc 780
caaaatggta ggtgcaccc tgaatgttaca ttgcaaggca caacacaatt ggttcccaca 840
cagatctgtg cttitlagagg caccctgac agccagaccg cgagagcggc cgattcaaca 900
gattcccccc agagagcccc taatcatcca ctgcacgtcc aagttaagaa cctagacggt 960
acacaatatg acccaacgga cgatatacct gcagtccttg gggctatga ctitcaaagg 1020
acagtccttg gagtggctag tcagagggat gtttctggac aacaagaaca gggccactat 1080
gccacccgag cccatgaagc acacatcgac acaactgac caaagtatgc acccaaatta 1140
ggcacaattc tcatiaaattc tggttctgat gatttcaata caaaccagcc cattagattc 1200
actccggtag gcattgggtga caacaattgg agacaatggg aattgcccga ctattctggc 1260
agattaacct taaatatgaa ccttgcctct gctgtttctc catctttccc tggatgaacga 1320
atccttttct tcaggctcat agtacctca gccggaggct acgggtcttg ctacatagac 1380
tgtctcatac cccaggaatg ggtgcagcac ttttaccagg aagcagcacc ttacaatct 1440
gctgttgcac tggtaggta tgcacaccc gatactgggc gtaacatcti tgaggccaaa 1500
ctgcacagag aagggttctt caccgtggcc aactgtggaa acaatcctat ttagtcccc 1560
cccaatggct atticagatt tgaggcttgg ggtaatcagt ttatatacti tgcccccatg 1620
ggatctggac aggggcgtag aagggccag taa 1653

```

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 1626

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Hu/NLV/Osaka 10-25/1999/JP

&lt;400&gt; 22

```

atgaagaagg cgtcgaatga cgcagctcca tctagtgatg gtgcagcagg cctcgtacca 60
gagatcaaca atgaggctat gcccctttaa cccgtggctg gtgcacgtct ggcgacacca 120
gtcgtcgggc aacaaaataa aatigatccc tggataagaa ataattttgt gcaggctcct 180
gcaggtagat ttactgtttc ccctaggaat tccccctggag aaattttgtc tgattttgaa 240
ttgggaccag atttgaatcc ctacctagcc catctggccc gcatgtataa tgggcacgct 300
ggcggcatgg aagtgcacaa ttgtctggct gggaatgcgt tcacagcagg caaatcata 360
tttgcctgcca tccccccagg gttcccatat gaaaatttgt caccitctca aattacaatg 420
tgccacatg ttataattga tgttaggcaa ttggagccat tctttttgcc tatgccagac 480
atttggaaata atttcttcca ttataatcag ggcaatgatc caaaattgag gctagtgtgt 540
atgctctata ctcctttgag ggctaaataa tctggtagtg atgtgttcac agtttcttgt 600
aggggtgctc caaaaccttc acccgacttt gaattcacat ttctagtctc cccacagtc 660
gagtctaaga ctaagcaatt cgctctgccc attctcaaaa tatcagagat gactaattca 720
agattcccag taccagtga tgtgatgtac acggccagga acgagaacca ggtcgtccaa 780
ccacagaatg gcagggtcac actcgacggt gaactgttgg gcaccactcc cctgttggct 840
gttaacatct gtaaatitaa gggagaagtc atagccaaaa atggggacgt gagatcctat 900
agaatggata tggaaatcac taacactgat ggaacacctt ttgacccac agaggacaca 960
cctggctcca ttggctcacc agattttcag ggcatacttt ttggcgttgc cagtcagcgc 1020

```



```

aataagaatg agcaaaaccc cgccacgagg gctcatgaag ccataattaa cactggigga 1080
gaccatttat gcccccaaat tagctcaagt gaaatttatc tcacaagtec caacattttg 1140
aggigcacca acccacaacc tttaacccag tgggggttgc gggggacaat tctcatccgt 1200
tcagacaatg gacactgcca cgatatgggt ggcacctcac caacaacacc cactggccc 1260
cagcagtggc gccgctgttc cggggggagc aattgctgtt cttcaggta cagataccca 1320
gttcgggtgg tcatgaatcg cgttacatgg attgcttgtt cccacaagag tgggttcagc 1380
acttctacca ggaagctgcc acagctcaat ctgaggtggc ccctcalaag attcatcaac 1440
ccagacactg gtagggctct ttttgaggct aggctacata agcaaggctt cataactgtg 1500
gctacatccg gtgacaaccc aattgcatg ccaccaaalg ggtatttcag gttgaagct 1560
tgggtcaatc agttttattc acttgcccc gttgggaact ggaaagggcg tagaagggtc 1620
caataa 1626

```

&lt;210&gt;23

&lt;211&gt;21

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;23

aatgatgatg gcgtctaagg a 21

&lt;210&gt;24

&lt;211&gt;33

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;24

ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttt 33

&lt;210&gt;25

&lt;211&gt;24

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;25

gccattatcg gcgcaracca agcc 24

&lt;210&gt;26

&lt;211&gt;20

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;26





tgacctcgga ttgtggacag 20

<210>27

<211>31

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>27

gcgaattctt atctacggac accaagccta c 31

<210>28

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>28

gtgaatgaag atggcgctga 20

<210>29

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>29

ccattataat gcacgcctgc gcc 23

<210>30

<211>22

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>30

ttgtgaatga agatggcgtc ga 22

<210>31

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>31

aattattgaa tccttctacg cccg 24



<210>32

<211>28

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>32

aattactgaa cccttctacg cccatttc 28

<210>33

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>33

ccataactga acccttctac gcc 23

<210>34

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>34

atgaagatgg cgtcgaatga cg 22

84x2